

Eerika Pasanen

Puhtaanapidon seurantajärjestelmän kehittäminen luminometrillä

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Insinöörityö

28.5.2015

Tekijä(t) Otsikko Sivumäärä Aika	Eerika Pasanen Puhtaanapidon seurantajärjestelmän kehittäminen lu- minometrillä 35 sivua + 3 liitettä 28.5.2015
Tutkinto	insinööri (AMK)
Koulutusohjelma	Bio- ja elintarviketekniikka
Suuntautumisvaihtoehto	Elintarviketuotanto ja bioprosessit
Ohjaaja(t)	Lehtori Carola Fortelius Laatuvastaava Piia Manninen
<p>Elintarvikehuoneiston puhtaustasoa ja puhtaanapidon tehokkuutta voidaan arvioida usealla eri menetelmällä. Yleisesti käytetään aistinvaraista arviointia, näytteenottoa ja mikrobiologisia analyysimenetelmiä sekä ATP:iin ja luminometriaan perustuvia menetelmiä. Luminometrimittauksen avulla voidaan todeta sekä ruoka-ainejäämien että elinkykyisten mikrobien olemassaolo näytteessä.</p> <p>Insinöörityössä laadittiin Kalatukku E. Eriksson Oy:lle osastokohtaiset näytteenottosuunnitelmat luminometrimittauksille. Työssä määritettiin näytteenottokohteet, -tiheys ja raja-arvot hyväksytyille ja hylätyille tuloksille. Henkilökunta koulutettiin näytteenottoon ja laadittiin yksityiskohtaiset näytteenotto-ohjeet luminometrimittauksia varten. Työn aikaisesta tuloseurannasta laadittiin tulostaulukoita ja vertailtiin saatuja tuloksia osastoittain, kohderyhmittäin ja puhdistusmenetelmittäin. Tulosten tarkastelussa hyödynnettiin varianssianalyysia.</p> <p>Varianssianalyysin tulokset osoittivat, että yrityksen puhtaustaso ei merkitsevästi vaihtelee osastojen tai käytettyjen puhtaanapitomenetelmien välillä. Näytteenottokohteiden ryhmitäisessä vertailussa havaittiin kuitenkin, että yhden kohderyhmän mittaustulokset poikkesivat muista tilastollisesti merkitsevästi (p-arvo $< 0,05$). Poikkeavat tulokset voivat johtua näytteenottokohteiden ominaisuuksista, kuten materiaalista ja kuluneisuudesta tai käytöstavasta.</p> <p>Työn valmistuttua yrityksellä oli käytössään omavalvontasuunnitelmaan sisällytettävä, johdonmukainen näytteenottosuunnitelma luminometrimittauksille. Yrityksen luminometrimittaukset olivat aiemmin vaihdelleet näytteenottotavan, -pinta-alan ja -tiheyden suhteen. Tulevaisuudessa laadittua näytteenottosuunnitelmaa päivitetään säännöllisesti yrityksen laadunvalvonnan toimesta.</p>	
Avainsanat	Puhtaustaso, luminometri, näytteenottosuunnitelma

Author(s) Title	Eerika Pasanen Developing the sanitation monitoring system with luminometric measurements
Number of Pages Date	35 pages + 3 appendices 28 May 2015
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Biotechnology and Food Engineering
Specialisation option	Food production and Bioprocesses
Instructor(s)	Carola Fortelius, Senior Lecturer Piia Manninen, Quality manager
<p>The cleanliness level and efficiency of sanitation in a food establishment can be evaluated by several different techniques. Common methods are sensory evaluation, microbiological analysis and methods based on ATP and bioluminescence. By using luminometric measurement, both food residues and viable micro-organisms can be determined from the sample.</p> <p>The purpose of this thesis was to prepare a sampling plan for luminometric measurements for Kalatukku E. Eriksson Oy. Departmental sampling targets, sampling frequency and limit values for approved and rejected results were determined. The personnel were trained to take samples and use the luminometer-device. Written, detailed instructions for luminometric measurements were also drawn up. Based on the results during the follow-up, there were created plots and comparisons of the results within departments, target groups and cleaning methods. The results were analyzed by utilizing analysis of variance.</p> <p>The results of the analysis of variance showed that the cleanliness level of the company did not significantly vary between departments or cleaning methods. When comparing target groups, one of the groups differed statistically significantly (p-value < 0,05) from the others. This could be caused by the properties of the targets, such as material, weariness and purpose of use.</p> <p>As the thesis was completed, the company had a consistent sampling plan for luminometric measurements that was included to the in-house control plan. The luminometric measurements had earlier been varying with respect to the sampling practice, surface area and frequency. In the future, the sampling plan will be updated on a regular basis by the quality control of the company.</p>	
Keywords	cleanliness level, bioluminescence, sampling plan

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
---	----------	---

TEOREETTINEN OSA

2	Lainsäädäntö ja omavalvonta	2
2.1	Omavalvonta ja HACCP	2
2.2	Elintarvikelaki	3
3	Pintahygienia elintarviketeollisuudessa	3
3.1	Puhdistusmenetelmät	3
3.2	Pesu- ja desinfiointiaineet	5
3.3	Puhdistusvälineet ja koneellinen pesu	8
3.4	Puhtauden arviointi	8
4	Mikrobit elintarviketeollisuudessa	9
4.1	Mikrobit kalateollisuudessa	9
4.2	<i>Listeria monocytogenes</i>	10
4.3	Tapaustutkimus	11
4.4	Biofilmit	13
4.4.1	Biofilmien kiinnittyminen	13
4.4.2	Biofilmit kalateollisuudessa	14
4.4.3	Biofilmien ehkäisy	15
5	Luminometrimenetelmä	16
5.1	Analyysimenetelmät	16
5.2	Bioluminesenssi	17
5.3	Luminometrimenetelmän näytteenotto	17

KOKEELLINEN OSA

6	Työn tarkoitus	18
---	----------------	----

7	Materiaalit ja menetelmät	19
7.1	Näytteenottokohteiden määrittäminen	19
7.2	Näytteenottotiheyden ja raja-arvojen määrittäminen	20
7.3	Näytteenotto-ohjeiden luominen ja henkilökunnan koulutus	21
7.4	Poikkeamakirjanpito ja uusintanäytteet	22
8	Tulokset	22
9	Tulosten tarkastelu ja varianssianalyysi	25
9.1	Osastojen välinen vertailu	27
9.2	Kohteiden välinen vertailu	28
9.3	Puhdistusmenetelmien vertailu	30
10	Yhteenveto	32
	Lähteet	34
	Liitteet	

Liite 1. Luminometrin maahantuojayrityksen taulukko raja-arvojen vaihteluvälien ohje-arvoista

Liite 2. Varianssianalyysin tulokset

Liite 3. Tukeyn testin tulos

Lyhenteet

ANOVA	<i>Analysis of variance.</i> Varianssianalyysi on menetelmä, jonka avulla voidaan selvittää eroavatko ryhmien keskiarvot toisistaan tilastollisesti merkitsevästi.
ATP	Adenosiinitrifosfaatti, solun energiamolekyyli.
EPS	<i>Extracellular polymeric substance.</i> Solunulkoinen polymeeriaine, mikrobin tuottama aine.
HACCP	<i>Hazard analysis and critical control points.</i> Vaarojen analysointi ja kriittiset ohjauspisteet -järjestelmä, joka on yksi osa elintarvikehuoneiston omaavalvontaa.

1 Johdanto

Kalatukku E. Eriksson Oy on perustettu vuonna 1880 nimellä Kalakauppa E. Eriksson. Yritys on säilynyt saman suvun hallinnassa aina perustamisesta lähtien. Kalatukku E. Eriksson Oy toimii fine dining -ravintoloiden, henkilöstöravintoloiden ja vähittäiskauppojen kalatoimittajana. Yritys toimittaa tuotteitaan pääsääntöisesti Etelä-Suomen alueelle, mutta myös muualle Suomeen. Kalatukku E. Eriksson Oy:n tuotantolaitos sijaitsee Helsingin Roihupellossa, jonka yhteydessä toimii myös tehtaanmyymälä. Tämän lisäksi Kalatukku E. Eriksson Oy:llä on myymälä Vanhassa kauppahallissa. Kalatukku E. Eriksson Oy:n tuotevalikoimaan kuuluu yli 1000 erilaista kalastustuotetta.

Työn tarkoituksena on kehittää Kalatukku E. Eriksson Oy:n puhtaanapidon seuranta järjestelmää luminometrin avulla. Työssä luodaan yritykselle osastokohtainen näytteenottosuunnitelma luminometrimittauksia varten, luodaan kirjalliset ohjeet näytteenottoa varten, koulutetaan henkilökunta näytteenottoon ja kehitetään tuloksista tulostaulukot ja -kuvaajat. Työn seuranta-aikana saatujen tulosten perusteella vertaillaan yrityksen puhtaustasoa eri osaryhmien välillä.

Näytteenottosuunnitelma sisällytetään yrityksen omavalvontaan ja suunnitelmaa päivitetään jatkossa säännöllisesti yrityksen laadunvalvonnan toimesta.

Elintarvikehuoneiston pintapuhtauden tutkimiseen luminometrimenetelmä soveltuu hyvin, sillä menetelmä osoittaa sekä orgaanisen lian että mikrobialaisen aineksen. Menetelmä perustuu adenosiniitrifostaatin (ATP) valoa tuottavaan reaktioon yhdessä lusiferiinin kanssa, entsyymien toimiessa katalyyttinä. Luminometri mittaa syntyneen valon määrää ja tämä on suoraan verrannollinen ATP:n määrään. Menetelmä on helppokäyttöinen ja nopea, sillä näytteen tulos saadaan jopa alle minuutissa.

TEOREETTINEN OSA

2 Lainsäädäntö ja omavalvonta

2.1 Omavalvonta ja HACCP

Omavalvonta kuuluu jokaisen elintarviketoimijan velvollisuuksiin (pois lukien raaka-aineita tuottavat maatalousyrittäjät). Omavalvonnalla pyritään varmistamaan elintarvikkeiden turvallisuus ja, että ne ovat lainsäädännön vaatimusten mukaisia. [1, s. 104]

Omavalvontasuunnitelman tulee olla kirjallisessa muodossa ja siihen kirjataan koko yrityksen toiminnan vaiheet (valmistus, pakkaus, varastointi), jotka liittyvät elintarvikkeisiin. Omavalvonnan avulla voidaan havaita toiminnan mahdolliset turvallisuus- ja hygieniariskit ja välttää niiden muodostuminen. [1, s. 104]

Omavalvontasuunnitelman noudattamista valvoo kunnan valvontaviranomainen, joka voi tarvittaessa tarkistaa omavalvonnan mittaus- ja analyysitulokset. Omavalvontaan kuuluvat näytteenotot ja tutkimukset on yrityksen itse kustannettava. [1, s. 105]

HACCP eli Hazard Analysis and Critical Control Points -järjestelmä on oleellinen osa omavalvontaa. HACCP-järjestelmän avulla pyritään tunnistamaan elintarviketeollisuudessa ilmeneviä vaaratekijöitä ja arvioimaan riskejä sekä määrittämään toiminnan kriittisiä valvontakohtia tai ohjauspisteitä. Kriittiset ohjauspisteet ovat elintarviketoiminnan kannalta erityisen riskialttiita toimintoja, jotka voivat vaarantaa elintarvikkeen turvallisuuden. Elintarviketoimijan tehtävänä on laatia yrityksen toimintaa koskeva arvio mahdollisista vaaratekijöistä ja riskeistä, sekä suunnitella näiden valvontaan ja toimintasuunnitelmat riskitilanteisiin. [1, s. 105]

Standardoituun HACCP-järjestelmään kuuluu seitsemän periaatetta, jotka toimivat lähtökohtana järjestelmälle. Nämä ovat vaaratekijöiden tunnistaminen, kriittisten ohjauspisteiden määrittäminen, raja-arvojen määrittäminen jokaiselle kriittiselle ohjauspisteelle, seurannan suunnittelu, tulosten kirjaaminen, korjaavien toimien määrittäminen ja järjestelmän toimivuuden arviointi. [2, s. 79–80]

Järjestelmää sovelletaan eri toiminta-aloilla eri tavalla ja parhaiten se soveltuu periaatteeseen elintarvikkeiden valmistuksen valvontaan, jossa voidaan määrittää selkeitä raja-arvoja ja kriittisiä ohjauspisteitä. Järjestelmän tarkoituksena on varmistaa, että elintarviketoimija arvioi ja analysoi sekä kontrolloi ja minimoi toiminnan vaaratekijöitä, ja huolehtii näiden seurannasta ja dokumentoinnista. [1, s. 108]

2.2 Elintarvikelaki

Elintarvikelain tarkoituksena on muun muassa varmistaa elintarvikkeiden turvallisuus, suojata kuluttajaa elintarvikkeiden terveysturvallisuudelta ja turvata korkealaatuinen elintarvikevalvonta [3]. Elintarviketurvallisuuteen ja -hygieniaan liittyvää lainsäädäntöä uudistetaan jatkuvasti ja voimassaolevat säädökset löytyvät Suomen sähköisestä säädöskoelmasta osoitteesta www.finlex.fi. [2, s. 112]

Elintarvikelain lisäksi esimerkiksi myös maa- ja metsätalousministeriön asetus laitosten elintarvikehygieniasta, sekä eläimistä saatavien elintarvikkeiden hygienia-asetus säätelevät kalastustuotteita käsitteleviä laitoksia koskevia vaatimuksia. [4]

3 Pintahygienia elintarviketeollisuudessa

3.1 Puhdistusmenetelmät

Elintarvikealalla toimivan yrityksen omavalvontasuunnitelman tulee sisältää kirjallisista ohjeista koostuvan puhdistussuunnitelman, joka kattaa kaikki elintarvikehuoneiston kohteet [1, s. 83–84; 5 s. 366]. Puhdistusmenetelmä valitaan kohteen sekä lian määrän ja tyyppin mukaan. Puhdistuksen tavoitteena voi olla poistaa kohteesta likaa, pölyä, tahroja, irtoroskia tai saostumia, kohteen ja tilanteen vaatimalla tasolla. [1, s. 83–84] Suoraan elintarvikkeiden kanssa kosketuksissa olevat pinnat ja välineet tulisivat olla tarkassa valvonnassa puhdistustoimien suhteen ja erityisesti ne kohteet, joissa elintarvike on kuumennuksen jälkeen kosketuksessa pintaan. [2, s. 49]

Puhdistusmenetelmät voidaan jakaa neljään luokkaan käytettävän veden määrän perusteella. Luokat ovat märät menetelmät, kosteat menetelmät, nihkeät menetelmät ja

kuivat menetelmät. [2, s. 49; 1, s. 84] Esimerkiksi herkän sähkölaitteen puhdistus eroaa huomattavasti kostean tilan lattian pesusta.

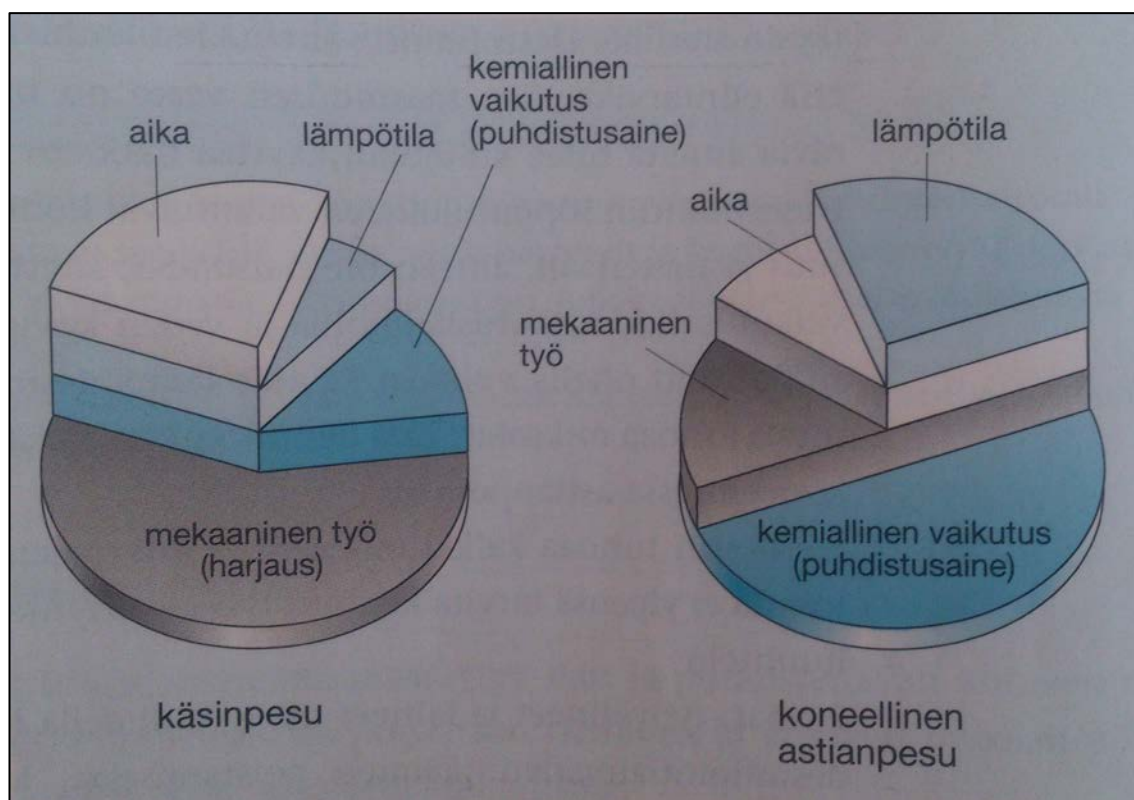
Puhdistuksen ensimmäinen vaihe on esipesu, jolloin poistetaan irtolika ja tarvittaessa liuotetaan kuivunut tai kiinnipalanut lika. Denaturoitunut proteiini vaatii usein liuotusta, mutta myös tärkkelys ja sokeri voivat olla tiukasti tarttuneita pintaan. Rasvalika vaatii pääsääntöisesti emäksisen pesuaineen ja kuuman veden varsinaisen pesun yhteydessä, eikä liuotus yleensä tehoa siihen. Huokoiseen pintaan tai vaikeasti puhdistettaviin kulmiin on saattanut muodostua biofilmi. [2, s. 51–52]

Varsinainen pesu tarkoittaa veden ja sopivan pesuaineen käyttöä puhdistuksessa. Pesuaine voi myös olla pinnalle levitettävä vaahto tai geeli. Pesutulokseen vaikuttaa positiivisesti harjan tai painepesulaitteen käyttö. Nykyään suositaan enemmän matalapainepesua kuin korkeapainepesua, matalapaineen tehokkuuden, ajansäästön ja vähemmän melun ja roiskeen vuoksi. [2, s. 53]

Huuhteluvaiheessa on huolehdittava, että lika ja puhdistusaine poistuvat kokonaan. Huuhteluveden lämpötila saa olla korkea (75–85 °C), jotta lisääntymiskykyiset bakteerit saadaan tapettua mahdollisimman tehokkaasti. Huuhtelun jälkeen tulee kuivata pestyt pinnat, etteivät pinnoille mahdollisesti jääneet mikrobit pääse lisääntymään. [2, s. 53–54]

Pesun jälkeen suoritetaan tarvittaessa desinfiointi ja/tai sterilointi. Yksinomaan desinfiointi ei riitä hyvän puhtaustuloksen saavuttamiseksi, vaan kohde tulee aina ensin pestä. [1, s. 85]

Puhdistuksen lopputulokseen vaikuttavat puhdistuksen aikana suoritettu mekaaninen ja kemiallinen työ, sekä aika ja lämpötila. Osa-alueet ovat toisistaan riippuvia, eli jos yhtä osa-aluetta vähennetään, on toisen määrää lisättävä. Kuvassa 1 on esitetty käsinpesun ja koneellisen astianpesun erot puhdistuksen osa-alueissa. [1, s. 85–86]



Kuva 1. Käsipesun ja koneellisen astianpesun osa-alueet ovat toisistaan riippuvia. Kun yhden osa-alueen osuutta pienennetään, on toisen osa-alueen osuutta kasvatettava, jotta saadaan samanlainen puhdistustulos eri pesumenetelmillä. [1, s. 86]

3.2 Pesu- ja desinfiointiaineet

Puhdistus- ja desinfiointiaineet tulisi valita puhdistettavan kohteen lian laadun ja määrän, puhtaustavoitteen ja käytettävissä olevien menetelmien mukaan [1, s. 86]. Pesuainneiden valinnassa tulee myös huomioida puhdistettavien pintojen materiaalit ja käyttöturvallisuus [2, s. 53]. Elintarviketiloissa käytettävien puhdistus- ja desinfiointiaineiden tulee ehdottomasti olla veteen liukenevia, sillä ainejäämiä ei saa jäädä puhdistettavien kohteiden pinnoille, jotka ovat kosketuksissa elintarvikkeiden kanssa [1, s. 86]. Elintarviketurvallisuusvirasto ohjeistaa lisäksi, että elintarvikehuoneistoissa puhdistus- ja desinfiointiaineina käytettävien aineiden on oltava tarkoitukseen sopivia [6].

Puhdistusaineet koostuvat kemiallisista aineosista, jotka perustuvat erilaisiin vaikutustapoihin ja soveltuvat siten erilaisiin käyttökohteisiin. Puhdistusaineet sisältävät vaikuttavien aineiden lisäksi usein myös esimerkiksi hajusteita ja väriaineita, vaahdonestoainetta, säilytysainetta ja liukoisuutta lisääviä aineita. [1, s. 86–88] Desinfiointiaine saat-

taa myös sisältää pesuaineeseen. Elintarvikealalla suositus on, että pinta puhdistetaan ensin perusteellisesti ja tarvittaessa desinfioidaan pinta vasta pesun jälkeen. Pesuaineiden pH on usein neutraali tai emäksinen. [2, s. 57–58]

Tuotantopintojen, tuotteiden tai huuhteluveden pesuainejäämiä voidaan mitata pesuainejäämien mittaukseen tarkoitetun testin ja luminometrin avulla. Pesuainejäämätimenetelmä perustuu *Vibrio fischeri* -bakteerin bioluminesenssireaktioon, eli luonnolliseen valontuottoreaktioon. [7]

Tensidit

Synteettiset tensidit ja luonnontensidit ovat orgaanisia hiilivetyjä, jotka toimivat parhaiten emäksisessä ympäristössä [2, s. 57]. Ne ovat pinta-aktiivisia aineita, jotka vähentävät veden pintajännitystä ja toimivat likaa irrottavasti ja pilkkovasti. Tensidejä käytetään yleisesti puhdistusaineissa, sillä ne estävät myös lian uudelleen tarttumisen. [1, s. 87]

Emäkset

Puhdistusaineliuokseen lisätyt pesuemäkset nostavat liuoksen pH:ta. Emäksiset puhdistusaineet toimivat tärkkelystä ja valkuaisaineita hajottavasti ja happamuutta neutraloivasti. [1, s. 87] Voimakkaat emäksiset puhdistusaineliuokset ovat tehokkaita rasvali- an irrottajia. Emäksisinä aineina puhdistusaineissa käytetään esimerkiksi lipeää (NaOH), ammoniakkiliuosta tai sen yhdisteitä. Emäksillä on lisäksi mikrobeja tuhoavia ominaisuuksia ja ne syövyttävät tiettyjä materiaaleja, kuten metalleja. Vähemmän syövyttäviä aineita ovat emäksiset suolat, kuten karbonaatit, fosfaatit ja silikaatit, jotka kuitenkin irrottavat valkuaisaineita ja rasvaa tehokkaasti. [2, s. 57]

Hapot

Happamien puhdistusaineiden avulla voidaan poistaa esimerkiksi kalkki- tai ruostesaostumia [2, s. 58; 1, s. 87]. Happamat puhdistusaineet sisältävät epäorgaanisia tai orgaanisia happoja tai niiden suoloja. Pesuaineissa käytettyjä happoja ovat esimerkiksi sitruunahappo ja typpihappo. [2, s. 58]

Desinfiointiaineet

Desinfiointiaineet on yleisnimitys kemikaaleille, jotka tuhoavat mikrobeja [1, s. 87; 2, s. 60]. Näitä ovat esimerkiksi klooriyhdisteet, kuten hypokloriitit ja dikloori-isosyanuraatit. Kloori on laajavaikutteinen ja nopea tehokeino mikrobeja vastaan. Kloori on kuitenkin ihoa ja limakalvoja ärsyttävää, minkä lisäksi se on allergisoiva ja aiheuttaa hajuhaittoja. Klooria sisältäviä desinfiointiaineita käytettäessä on noudatettava tarkasti käyttöohjeita, sillä ne aiheuttavat myös pintojen korroosiota ja niistä voi muodostua myrkyllisiä yhdisteitä. [2, s. 60–61]

Alkoholeja käytetään myös yleisesti desinfiointiaineena, erityisesti etanolia ja isopropanolia. Alkoholiliuoksen ollessa 80 %:sta sen teho mikrobeja vastaan on parhaimmillaan. Alkoholia ei ole tarpeen huuhdella pois pinnalta, joten se soveltuu myös herkille pinnoille ja esimerkiksi sähkölaitteiden desinfiointiin. Pintojen tulee kuitenkin olla pestyjä ennen alkoholia sisältävien desinfiointiaineiden käyttöä. [2, s. 61]

Kvaternaaliset ammoniumyhdisteet eli kvatit ovat lämmönkestäviä, hajuttomia ja väritömiä aineita, jotka toimivat rasvalian hajottajina. Kvattien tehoa heikentävät kuitenkin anioniset tensidit, saippuat ja valkuaislika, joten ne soveltuvat huonosti likaisen pinnan desinfiointiin. [2, s. 61] Lisäksi esimerkiksi *Listeria monocytogenes* voi muodostaa resistenssin kvaternaalisia ammoniumyhdisteitä kohtaan [5, s. 367].

Peroksideja ja perhappoja käytetään esimerkiksi prosessiteollisuuden clean-in-place-pesuissa suljetuissa laitteistoissa. Näiden aineiden vapautuva aktiivinen happi on tehokas puhdistuskeino, mutta samalla aineet ovat usein pahanhajuisia ja syövyttäviä. [2, s. 61–62]

Desinfiointiaineiden puhdistustulokseen vaikuttavat monet seikat: käytetty aine ja sen vahvuus, lämpötila, vaikutusaika ja pH, pinnan materiaali, veden kovuus, lian määrä ja mikrobien laatu [1, s. 85]. Desinfiointi tulee aina suorittaa puhdistetulle pinnalle, sillä lika heikentää desinfiointiaineen tehoa. Mikrobit voivat myös muodostaa desinfiointiaineille resistenttejä kantoja. [2, s. 60]

Ultraviolettivalo

Ultraviolettivaloa voidaan käyttää esimerkiksi veden ja muiden nesteiden sekä ilman desinfiointiin. Ultraviolettisäteilyn teho mikrobeja tuhoavana desinfiointimenetelmänä perustuu sen kykyyn muuttaa mikrobien perimäainesta. Ultraviolettisäteily jaetaan kolmeen ryhmään aallonpituuden perusteella (UVA = 315–380 nm, UVB 280–315 nm ja UVC < 280 nm). Tehokkain desinfiointivaikutus saavutetaan yli 280 nanometrin aallonpituusalueella, eli UVC-alueella. [5, s. 368]

3.3 Puhdistusvälineet ja koneellinen pesu

Puhdistusvälineiden kunnolla ja oikealla käyttö- ja säilytystavalla on merkitystä puhtaanapidon kannalta. Puhdistusvälineet eivät saa toimia mikrobikontaminaation lähteenä, joten eri tiloilla ja pinnoilla tulee olla omat puhdistusvälineet. Näin ollen myös näiden puhdistusvälineiden säilytystilojen tulee olla erillään toisistaan. Puhdistusvälineiden tulee olla laadukkaita, sekä kuumuutta ja vahvoja puhdistusaineita kestäviä. [1, s. 89–90]

Elintarvikkeiden valmistuksessa käytetyt välineet, jotka pestään koneessa, tulisi esihuuhdella ennen koneeseen asettamista. Sopiva huuhtelulämpötila on n. 35–40 °C, jolloin vesi ei polta valkuaisaineita kiinni pintoihin. Koneellisen pesun veden lämpötila tulee olla 60–65 °C, jolloin pesuteho on riittävä, mutta lika ei pala kiinni pintoihin. Huuhteluvesi pesun päätteeksi saa olla 80–85 °C, jolloin pestyt välineet kuivuvat nopeammin. Koneellisen pesun vesien lämpötilaseuranta tulisi sisällyttää omavalvontasuunnitelmaan. [1, s. 91–92]

3.4 Puhtauden arviointi

Elintarvikehuoneiston puhtautta voidaan arvioida aistinvaraisin havainnoin, jolloin on mahdollista todeta esimerkiksi näkyvää likaa tai hajuja. Suomen lainsäädäntö vaatii kuitenkin tiettyjen elintarvikealojen (mm. kala- ja liha-alojen) laitoksien sisällyttävän omavalvontasuunnitelmaansa pinta- ja puhtausnäytteiden ottamisen. Näytteenoton avulla saadaan todenmukaista tietoa puhtaanapitomenetelmien riittävydestä ja toimivuudesta. Näytteenottokohteiksi tulisi valita sekä tuotantohygienian kannalta kriittisiä

kohteita että kohteita, jotka osoittavat puhdistuksen laadun. Pintahygienian seurantaan on markkinoilla useita eri vaihtoehtoisia menetelmiä. [1, s. 92–94]

4 Mikrobit elintarviketeollisuudessa

Elintarviketeollisuuden puhtaanapidossa tulee kiinnittää erityistä huomiota yleiseen hygieniatasoon sekä puhdistus- ja desinfiointimenetelmiin. Monet biofilmejä muodostavat bakteerit ovat patogeenisiä ja voivat aiheuttaa elintarvikkeiden kontaminaatioita, vaikuttaa tuotteen laatuun negatiivisesti tai aiheuttaa terveystarvekuluttajalle. Pinnoille kiinnittyvät bakteerit voivat säilyä elinvoimaisina puhdistuksesta ja desinfioinnista huolimatta – etenkin jos samoilla välineillä tai pinnoilla käsitellään sekä raakaa että kypsennettyä tuotetta, on kontaminaatoriski huomattava. [8, s. 240]

Prosessiympäristön mikrobisto koostuu pääsääntöisesti eri mikrobilajeista ja siihen vaikuttavat prosessoitavien tuotteiden oma, luonnollinen mikrobifloora sekä laitoksen ulkopuolelta tulleet mikrobit. Elintarvike voi kontaminoitua joko huonosti puhdistetun pinnan tai välineen kautta tai kontaminaation voi aiheuttaa ulkopuolinen tekijä, kuten henkilökunta, ilmastointi tai tuhoeläimet. [5, s. 363; 8, s. 240]

Kalateollisuuden ongelmakohdat tuotantohygienian näkökulmasta ovat laitteet, jotka ovat hankalia purkaa ja puhdistaa, esimerkiksi fileointi-, nahanpoisto- ja suolauslaitteet. Kylmäsavustetut ja graavatut kalatuotteet päätyvät kuluttajalle ilman, että ne olisivat käyneet läpi kuumennuskäsittelyn ja ne myös syödään kuumentamattomina. Lämminsavustettu kala käy läpi kuumennuskäsittelyn savustuksen aikana, mutta se voi jälki-kontaminoitua ennen pakkausta tai sen aikana. [5, s. 362]

4.1 Mikrobit kalateollisuudessa

Tuoreen kalan käsittelyssä on ehdottomasti huolehdittava katkeamattomasta kylmäketjusta kalan kuljetuksen ja varastoinnin ajan [5, s. 211]. Tuoreiden kalastustuotteiden säilytyslämpötilan tulee olla 0–2 °C, tyhjiö- ja suojakaasupakattujen kalajalosteiden sekä tuoresuolattujen ja kylmäsavustettujen kalastustuotteiden säilytyslämpötilan 0–3 °C [9].

Kalan normaaliflooraan kuuluvat *Pseudomonas* spp. ja *Shewanella putrefaciens* toimivat usein jäitetyn tuoreen kalan pilaajina, mutta myös *Aeromonas*, *Acinetobacter* ja *Moraxella* ovat tyypillisiä. Suojakaasupakkaaminen estää *Pseudomonaksen* ja *Shewanellan* lisääntymistä, mutta tyhjiö- ja suojakaasupakattujen kalojen pilaajia ovat *Photobacterium phosphorum* ja *Bronchothrix thermosphacta*. [5, s. 214–215] *Aeromonas*-bakteereita esiintyy niin suolaisissa kuin makeissa luonnonvesissä, joten ne ovat yleisiä myös kaloissa, äyriäisissä ja simpukoissa. Kuumennus kuitenkin tuhoaa bakteerin. [5, s. 217] Tyhjiö- ja suojakaasupakkauksissa viihtyvää *Clostridium botulinumia* esiintyy myös vesistöissä ja se voi lisääntyä jos pakatun kalan riittävän alhaisesta säilytyslämpötilasta ei huolehdi. Myös *Clostridium perfringens* -bakteeria voi esiintyä kaloissa taudinaiheuttajana. Itiöt eivät tuhoudu lämminsavustuksen aikana, joten lämminsavustetut kalat ovat erityisen riskialttiita. [5, s. 217–218]

Prosessoitujen kalojen riski kontaminoitua *Listeria monocytogenes*-bakteerista on merkittävä. Kalassa voi olla bakteeria jo ennen käsittelyä, mutta yleensä kontaminaatio tapahtuu käsittelyn, kuten siivutuksen tai pakkauksen aikana. Graavattu ja kylmäsavustettu kala ovat *Listerian* suhteen riskielintarvikkeita. *Staphylococcus aureus* esiintyy myös erityisesti kuumennetuissa kalatuotteissa kuumennuksen jälkeisen kontaminaation seurauksena. *Vibrio*t ovat erityisesti äyriäisissä esiintyviä patogeeneja. Patogeenisiä viruksia, kuten hepatiitti A:ta ja norovirusta, esiintyy ostereissa ja simpukoissa. Virukset tuhoutuvat 2 minuutin 90 °C:een kuumennuskäsittelyssä, mutta osterit syödään usein raakoina. Tiettyjen järvikalojen ja äyriäisten potentiaaliset loistartunnat voidaan estää riittävällä pakastamisella tai kuumennuksella. [5, s. 218]

4.2 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes on *Listeria*-suvun kuudesta bakteerilajista ainoa humaanipatogeeni. *Listeria monocytogenes* ilmenee myös eläimissä taudinaiheuttajana. *L. monocytogenes* on aerobisissa ja anaerobisissa olosuhteissa lisääntyvä Gram-positiivinen sauva. *L. monocytogenes* kasvaa monissa vaihtelevissa olosuhteissa – se on psykrofiili, joka lisääntyy jopa jääkaappilämpötilassa, kasvaa tyhjiö- ja suojakaasupakkauksissa, sietää hyvin lämpöä ja suuria suolapitoisuuksia ja kasvaa laajalla pH-alueella (4,4–9,6). [5, s. 54–55]

L. monocytogenes esiintyy yleisesti maaperässä, vesistöissä, jätevesissä, säilörehussa ja eläinten ulosteessa. Bakteeria voi esiintyä missä tahansa elintarvikkeessa, joka on eläimestä tai kasvista peräisin. *L. monocytogenes* aiheuttaa listerioosia, joka esiintyy ihmisillä invasiivisena tai ei-invasiivisena. Invasiivinen muoto on erityisesti riskiryhmään kuuluville henkilöille riski, sillä 20–25 % invasiivisen muodon tartunnan saaneista potilaista menehtyy. Listerioosi-tapauksia on Suomessa todettu vuosittain 20–50. Aivokalvontulehdus, verenmyrkytys tai kuumeinen suolistotulehdus ovat esimerkkejä listerioosin kliinisistä muodoista. [5, s. 57–58]

L. monocytogenes on vaikeasti torjuttava elintarviketeollisuuden kontaminanttibakteeri. Bakteeri säilyy valmistustiloissa pitkään ja se viihtyy erityisesti pinnoilla, joissa on orgaanista jätettä. Elintarvikkeen kuumennuskäsittely tuhoaa bakteerin, mutta *L. monocytogenes* voi kontaminoida elintarvikkeen kuumennuksen jälkeisen käsittelyn aikana. *L. monocytogenes* esiintyy myös persistenttejä kantoja, jotka säilyvät tuotantotiloissa vuosien ajan. Näillä kannoilla on erityisominaisuuksia, jotka vaikeuttavat niiden tuhoamista. [5, s. 58–59]

Kuljettimissa ja laitteissa, kuten siivutuskoneissa, suolauskoneissa ja kuutioimiskoneissa elintarvikkeet kontaminoituvat herkästi. Laitteiden monimutkainen rakenne ja huono puhdistettavuus aiheuttavat niihin helposti tuotejäämiä, jotka ovat hyviä kasvupaikkoja monille bakteereille, kuten *L. monocytogenesille*. Bakteerikontaminaation estäminen tulee ottaa huomioon jo tuotantolaitoksen suunnittelussa ja laitevalinnoissa. [5, s. 60–61]

4.3 Tapaustutkimus

Tanskalaisessa tutkimuksessa Dorthe Bagge-Ravn [8, s. 239–250] kollegoineen pyrkivät selvittämään mitkä ovat kalateollisuudessa yleisimmin esiintyvät mikrobit ja missä käsittelyvaiheessa bakteeriryhmät kiinnittyvät pinnoille. Tutkimukseen osallistui kaksi savustuslaitosta, jotka tuottavat kylmäsavustettua lohta, yksi puolissäilykesilakoita valmistava laitos sekä yksi kaviaaria valmistava tuotantolaitos. [8, s. 239–240]

Savustuslaitoksissa todettiin esiintyvän *Pseudomonas*-, *Corynebacterium*-, *Acinetobacter*- ja *Alcaligenes* sukujen bakteerilajeja, Neisseriaceae-proteobakteereita, *Enterobacteriaceae*-heimon bakteereita ja maitohappobakteereita sekä hiivaa. Tuotantotilojen

puhdistus ja desinfiointi vähensi huomattavasti Gram-positiivisten bakteerien esiintyvyyttä, mutta Gram-negatiivisia bakteereita ja hiivaa esiintyi edelleen. [8, s. 245–246]

Puolisäilykesilakoita valmistavassa laitoksessa todettiin esiintyvän pitkälti samojen mikrobisukujen bakteereita kuin savustuslaitoksissa. Kaviaaria valmistavassa tuotantolaitoksessa todettiin sen sijaan esiintyvän Neisseriaceae-proteobakteereiden ja hiivan lisäksi *Staphylococcus*- ja *Vibrio*-sukujen bakteerilajeja. Puhdistuksen ja desinfioinnin jälkeen ainoastaan Neisseriaceaeen määrä oli vähentynyt. [8, s. 246]

Aiemmin vastaavissa tutkimuksissa on pääasiassa keskitytty bakteereiden kuten *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas* spp. ja *Escherichia coli* esiintyvyyteen kalateollisuudessa, mutta tämä tutkimus osoittaa, että tuotantopinnoille ja välineille tarttuu ja kiinnittyy hyvin laajasti eri mikrobilajeja. [8, s. 247]

Suurin osa tutkimuksessa havaituista bakteereista kuuluvat kalojen normaaliflooraan. Lohi, silakka ja rasvakala, jotka edustavat tutkimukseen osallistuneiden tuotantolaitosten raaka-aineita, ovat peräisin viileästä merivedestä. Psykrotrofiset ja psykrofiiliset bakteerit kuuluvat näin ollen tuoreen kalan mikrobiflooraan ja voivat myös toimia potentiaalisina pilaajabakteereina. Tyypillisiä psykrofiilisiä ja -trofisia Gram-negatiivisia bakteereita ovat *Acinetobacter*, *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Shewanella* ja *Vibrionaceae* ja Gram-positiivisia bakteereita puolestaan *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus* ja *Micrococcus*. Kalojen ulosteessa, suumuissa ja kiduksissa on todettu esiintyvän hiivoja. [8, s. 247–248]

Aiemmassa tutkimuksessa (Truelstrup Hansen et al, 1995) on todettu maitohappobakteerien ja *Enterobacteriaceae*-heimon bakteereiden olevan erityisesti kylmäsavulohen pilaajabakteereita. Kyseiset bakteerit sekä *Vibrio*-suvun bakteerilajit, on myös yhdistetty kaviaarituotteiden pilaantumiseen. Stafylokokkeja saattaa esiintyä tuoreen kalan mikrobifloorassa, mutta Bagge-Ravn kollegoineen osoittivat, että kaviaaria valmistavassa tuotantolaitoksessa esiintyi reilusti stafylokokkeja. Syyksi epäiltiin tuotantolaitoksen korkeita suolapitoisuuksia, jotka luovat halotoleranteille stafylokokeille suotuisat olosuhteet. [8, s. 248]

Tuotantolaitokset käyttivät desinfiointiaineiden lisäksi puhdistusmenetelminään matalapaineista vaahdottamista ja hypokloriittia, tai etikka- tai fosforihappoa. Puhdistukselle vastustuskykyisimmät mikrobit olivat hiivat ja *Pseudomonas* spp. Voidaan olettaa, että

näillä mikrobeilla on muita suurempi vastustuskyky puhdistusaineille, ne kiinnittyvät erityisen tehokkaasti pinnoille (muodostavat biofilmejä) ja selviytyvät pitkään ilman ravintoaineita. [8, s. 248]

Tuotantolaitosten tulisikin keskittää puhdistusmenetelmänsä ja desinfiointiaineensa niihin kyseisiin mikrobeihin, joita on todettu esiintyvän tuotantotiloissa. On syytä huomioida, että mikrobeja esiintyy tuotantopinnoilla ja -välineissä sekä tuotannon aikana, että puhdistuksen jälkeen. Tuotantolaitoksen mikrobifloora perustuu pitkälti käytettyjen raaka-aineiden ja valmistusaineiden (kuten säilöntäaineet) mikrobiflooraan. [8, s. 248]

4.4 Biofilmit

4.4.1 Biofilmien kiinnittyminen

Biofilmit ovat pinnoille kiinnittyneitä ja pinnoilla kasvavia keräymiä, jotka koostuvat mikro-organismeista. Biofilmien muodostuminen ja kehittyminen pinnoille riippuu monesta seikasta. Mikrobikanta, pinnan materiaali ja sen ominaisuudet ja ympäristöominaisuudet kuten pH, lämpötila ja ravinteiden saatavuus vaikuttavat biofilmien kehittymiseen. Biofilmissä bakteerit ovat paremmin suojautuneita puhdistusaineita vastaan kuin planktonmuotoiset bakteerit, joten tämä luo elintarviketeollisuuden puhtaanapitojärjestelmille haasteita. Pilaantumista aiheuttavat mikrobit ja patogeeniset mikrobit voivat muodostaa biofilmejä siinä missä mitkä tahansa mikro-organismit. Biofilmit muodostuvat vaihteittain ja niiden kehitystä voidaan kuvata viidellä eri vaiheella. [10, s. 573; 11, s. 407–409]

Ensimmäisessä vaiheessa mikrobit kiinnittyvät pintaan joko passiivisesti tai aktiivisesti ja tässä vaiheessa pinnan ominaisuudet vaikuttavat kiinnittymiseen. Biofilmejä voi muodostua minkä tahansa materiaalin pinnalle, kuten muoville, metallille, puulle tai lasille. Myös elintarvikkeen pinta voi tarjota bakteereille mahdollisen sijainnin biofilmin muodostamiselle. Pinnan ominaisuudet vaikuttavat siihen, minkä tyyppiset bakteerit voivat muodostaa sille biofilmin. Pinnan rakenne, varaus ja hydrofobisuus vaikuttavat kiinnittymiseen, kuten pH ja lämpötilakin. [10, s. 573]

Kun biofilmi kiinnittyy peruuttamattomasti pintaan (biofilmin muodostumisen toinen vaihe), vaaditaan jo vahvoja leikkausvoimia, kemikaaleja ja/tai kuumuutta, jotta biofilmin saa poistettua. Tässä vaiheessa biofilmi on muodostanut vahvan siteen pinnan so-

lunulkoisen polymeeriaineen (EPS) kanssa. Kolmannessa vaiheessa muodostuu mikrobiyhdyskuntia. Neljännessä ns. kypsymisvaiheessa biofilmi kehittyy lopulliseen muotoonsa, joka voi olla sienimäinen tai litteä. Biofilmi voi saavuttaa kypsymisvaiheen aikaisintaan kymmenessä päivässä. [10, s. 574]

Viides vaihe on biofilmin hajaantuminen. Tässä vaiheessa mikrobit pääsevät palautumaan planktonmuotoon ja biofilmi irrottautuu pinnasta. Hajaantuminen saattaa johtua ravinteiden loppumisesta tai muusta ulkoisesta häiriötekijästä. [10, s. 574]

Biofilmien käytös vaihtelee paitsi mikrobilajien välillä myös lajin sisällä eri kantojen ja serotyyppien välillä. Laji voi muodostaa voimakkaasti biofilmejä tietyssä ympäristössä, mutta heikosti toisessa. Esimerkiksi *Salmonella* spp:n ja *Listeria monocytogenes* on todettu muodostavan voimakkaasti biofilmejä muovisille pinnoille. Puupinnat ovat houkuttelevia kohteita biofilmien muodostukseen niiden huokoisuuden ja absorboimiskyvyn takia. Lasipinnat ovat sen sijaan vaikeampia kohteita biofilmien muodostukselle niiden sileän pinnan ja korroosionkestävyyden takia. Ruostumaton teräs on puolestaan herkkä korroosiolle, mutta sietää iskuja paremmin. Halkeamat, hitsaukset, kulmat ja työskentelyvälineet voivat myös tarjota mahdollisuuksia biofilmien muodostumiselle. [10, s. 574–575]

4.4.2 Biofilmit kalateollisuudessa

Kalateollisuudessa vedenlaatu ja työskentelyvälineet ovat tuotteiden laadun ja turvallisuuden kannalta oleellisia seikkoja, joihin tulee kiinnittää huomiota. Kalateollisuuden parissa esiintyy biofilmejä muodostavia bakteereita kuten *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* ja *Vibrio alginolyticus*. Lisäksi *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*-, *Pseudomonas*-, *Bacillus*- ja *Aeromonas*-suvun bakteerit ovat kala- ja äyriäistuotteisiin liitettyjä bakteereita – ja niin ikään biofilmejä muodostavia. Kun kalateollisuudessa käytetään prosessoitua merivettä makean veden sijaan, ovat *Vibrio*-suvun bakteerit tunnetusti aiheuttaneet kontaminaatioita. Kontaminaatiot ovat olleet peräisin biofilmeistä, jotka ovat muodostuneet vedenjakelujärjestelmään puhdistusprosessien jälkeen. [10, s. 576–577]

Tehokkaasta puhdistuksesta ja desinfioinnista huolimatta on kalankäsittelylaitoksista löytynyt useita ja katkaravunkäsittelylaitoksista lukuisia kiinnittyneitä bakteerilajeja (pääosin Gram-negatiivisia sauvoja). *Pseudomonas fluorescens* ja *Pseudomonas puti-*

da ovat tuoreen ja pakastetun kalan pilaajia, joita on esiintynyt erityisesti katkaravunkäsittelylaitoksissa. Tutkimuksessa (Gudbjörnsdóttir et al, 2005) on todettu *Pseudomonas*-suvun bakteerien olemassaolon kasvattavan *Listeria monocytogenes* -bakteerin kolonisaatiota ruostumattomasta teräksestä olevilla pinnoilla. Toisessa tutkimuksessa (Vestby, Møretrø, Langsrud, Heir & Nesse, 2009) huomattiin *Salmonellan* tiettyjen kantojen (*Salmonella montevideo* ja *Salmonella agona*) olevan tehokkaampia biofilmin muodostuksessa kuin toiset (*Salmonella typhimurium*). *Salmonellan* kohdalla todettiinkin biofilmin muodostumisen määräytyvän pääasiassa bakteerin kannan mukaan. [10, s. 577]

4.4.3 Biofilmien ehkäisy

Biofilmien ennaltaehkäisyssä tärkeintä on huolehtia tehokkaasta ja säännöllisestä puhtaanapidosta ja desinfioinnista. Näin voidaan välttää biofilmien peruuttamaton tarttuminen pinnoille. Biofilmejä voidaan vastustaa kolmella eri tavalla: käyttämällä olemassa oleviin biofilmeihin vahvoja desinfiointiaineita, ennaltaehkäisevästi puhtaanapidon avulla tai valitsemalla työskentelypintojen ja -välineiden materiaalit sen mukaan, etteivät ne tarjoa biofilmeille hyvää tarttumisalustaa. [10, s. 577]

Elintarviketeollisuuden ruoka-ainejäämät luovat biofilmeille otollisen ympäristön muodostua, joten puhtaanapidon merkitys kasvaa entisestään. Puhdistuksen tulisi olla tarpeeksi tehokas poistaakseen ruoka-ainejäämät, jotta siitä on hyötyä biofilmien torjunnassa. Puhdistuksessa voidaan käyttää erilaisia puhdistus- ja desinfiointiaineita apuna, lisäksi korkeilla pesulämpötiloilla voidaan vähentää mekaanisen hankauksen tarpeen määrää. Pelkkä puhdistaminen ei kuitenkaan tapa bakteereja, joten desinfiointi on ehdottoman tarpeellinen, jotta bakteerit voidaan poistaa kokonaan. Desinfiointiaineiden tehokkuuteen vaikuttavat kuitenkin mahdolliset proteiini-, hiilihydraatti- tai rasvajäämät. Lisäksi desinfiointiaineiden teho voi laskea vääränlaisen konsentraation, lämpötilan, pH:n tai veden kovuuden takia, myös kemialliset estoaineet voivat vaikuttaa desinfiointiaineeseen. [10, s. 578]

On todettu, että parhaimpaan pesutulokseen päästään yhdistämällä kemiallinen pesu ja mekaaninen hankaus, sillä mekaaninen hankaus ei yksinään poista biofilmiä. Lisäksi on todettu että esimerkiksi vetyperoksidin ja otsonin käyttö tehoaa biofilmeihin, mutta peretikkahapon osalta tulokset ovat ristiriitaiset. Koska mikrobeilla voi olla keinoja vastustaa kemiallisia puhdistusaineita joko luonnostaan tai ne voivat kehittää niitä geneet-

tisten mutaatioiden kautta, tulisi myös harkita muita keinoja biofilmien torjunnassa. Näitä ovat esimerkiksi entsyymien tai bakteriofagien käyttö. [10, s. 579–580]

5 Luminometrimenetelmä

5.1 Analyysimenetelmät

Elintarvikkeiden laadun ja turvallisuuden varmistaminen on jo kauan ollut tärkeä osa elintarviketeollisuutta. H. Bauman ehdotti jo vuonna 1970, että hitaiden ja aikaa vievien mikrobiologisten analyysien sijaan tulisi keskittyä laadunhallintaan, jonka voi tehdä ennaltaehkäisevästi ja ennen tuotannon aloittamista. Bauman esitteli ensimmäisenä HACCP-periaatteen. [12, s. 79–80]

Elintarviketeollisuudessa vallitsevaa puhtaustasoa ja puhtaanapidon tehokkuutta voidaan arvioida usealla eri menetelmällä. Yleisesti käytetään aistinvaraista arviointia, näytteenottoa ja mikrobiologisia analyysimenetelmiä sekä ATP:iin ja luminometriaan perustuvia menetelmiä. [12, s. 80]

Mikrobiologiset analyysimenetelmät maljaviljelyineen ovat pääsääntöisesti aikaa vieviä ja vaativat mikrobiologian osaamista ja laboratoriotyöskentelytaitoja. Mikrobien kasvatusta kestää keskimäärin vähintään 24–48 tuntia ennen kuin pesäkkeiden kokonaismäärä on mahdollista laskea. Mikäli on tarkoitus selvittää tietyn mikrobin (esimerkiksi *Salmonellan*) esiintyvyyttä näytteessä, voi tuloksen saamiseen mennä useita päiviä. Tuore-elintarvikkeen olleessa kyseessä, on tuote todennäköisesti jo ehtinyt myyntiin ja mahdollisesti jo kuluttajalle asti, ennen kuin analyysin tulos on käytettävissä. Kun puhtaustason tehokkuutta seurataan pelkästään aistinvaraisesti tai mikrobiologisin menetelmin, ei myöskään saada tietoa mahdollisista ruoka-ainejäämistä. Puhdistetun pinnan mahdolliset ruoka-ainejäämät tarjoavat mikrobeille erinomaisen kasvualustan. Lisäksi ruoka-ainejäämät voivat suojata pinnalle jääneitä mikrobeja desinfiointiaineilta. [12, s. 80]

Mikrobiperäistä tai orgaanista kontaminaatiota ilmaiseva, nopea puhtaustason arviointimenetelmä voi monessa tapauksessa olla tarpeen, sillä tällöin tilanteeseen voidaan puuttua ennen kuin elintarvikkeet joutuvat kosketuksiin kontaminoituneen pinnan tai välineen kanssa. [12, s. 80]

5.2 Bioluminesenssi

ATP eli adenosiinitrifosfaatti on kaikissa elävissä organismeissa esiintyvä energiamolekyyli. Sitä voi esiintyä tietyissä elintarvikkeissa ei-mikrobiaalisena ATP:na tai vapaana ATP:na. Luminometrimitauksella voidaan todeta sekä ruoka-ainejäämien että elinkykyisten mikrobien olemassaolo näytteessä. [12, s. 80]

Luminometrimitaus perustuu bioluminesenssireaktioon, eli tulikärpäsen tuottaman lusiferiinin kykyyn muodostaa valoa ATP-molekyylin kanssa, lusiferaasientsyymin toimissa reaktion katalyyttinä. Lusiferaasi-entsyymi käyttää ATP-molekyyliin sitoutunutta kemiallista energiaa hyväksi aiheuttaakseen lusiferiinin oksidatiivisen dekarboksylisaation. Optimaalinen reaktioaktiivisuus saavutetaan 20–22 °C lämpötilassa ja pH:ssa 7,75. Bioluminesenssireaktion biokemia on tunnettu jo 1940 luvulla ja nykyisin sitä käytetään elintarviketeollisuudessa muun muassa orgaanisen ja mikrobiperäisen kontaminaation tunnistamisessa luminometrin avulla. [12, s. 81]

Reaktioyhtälö [13, s. 114]:



Bioluminesenssireaktion tuottama valomäärä on suoraan verrannollinen orgaanisen ja/tai mikrobialisen aineen määrään [5, s. 372; 12, s. 81]. ATP:n määrää mitataan näin ollen suhteellisten valoyksiköiden määränä eli RLU:na (relative light unit). Suhteellisen valon määrän mittaa luminometri. Eri valmistajien luminometrien antamia tuloksia ei voi verrata keskenään, sillä laitteet on viritetty tietyn RLU-tason mukaan. Mittaustulos saadaan usein jopa alle minuutissa, joten menetelmä on selvästi nopeampi kuin mikrobiviljelymenetelmät. [12, s. 81]

5.3 Luminometrimenetelmän näytteenotto

Luminometrimenetelmässä näytteenotto perustuu yleensä siihen, että laitevalmistajan kertakäyttöisellä näytteenottopuikolla otetaan näyte halutulta alueelta, asetetaan näytteenottopuikko koteloon jossa reagenssi on valmiina ja ravistetaan näytteenottokotelo kevyesti. Tämän nopean sekoituksen jälkeen näytteenottokotelo asetetaan luminomet-

rin mittauskammioon, jolloin luminometri mittaa muodostuneen valon määrän ja antaa tuloksen RLU:na. [12, s. 81]

ATP:n määrä voi vaihdella sen mukaan, mitä materiaalia näytteenottopinta on, millä menetelmällä puhdistus on toteutettu ja mitä puhdistusaineita on käytetty. Kun määritetään raja-arvoja ATP-mittaustuloksille, tulisi näytteitä ottaa HACCP:n mukaisilta kriittisistä kohteista sekä satunnaisia näytteitä muista kohteista. [12, s. 82]

Luminometrimenetelmän hyödyt elintarviketeollisuuden puhtaanapidon seurannassa on mittaustuloksen nopeus ja se, että menetelmällä havaitaan sekä mahdolliset tuotejäämät että mikro-organismit. Menetelmä on helppokäyttöinen eikä vaadi erillisiä laboratorioita tai erityistä mikrobiologista koulutusta. [12, s. 82]

Menetelmän haittapuoli on kuitenkin se, ettei se kerro mahdollisten patogeenien olemassaolosta näytteessä. Lisäksi tietyt puhdistusaineet tai puhdistuksessa käytetyt kemikaalit voivat häiritä reaktiota. [12, s. 82]

KOKEELLINEN OSA

6 Työn tarkoitus

Insinööriyön tarkoituksena on kehittää Kalatukku E. Eriksson Oy:lle näytteenottosuunnitelmat osastoittain luminometrimittauksia varten. Näytteenottosuunnitelmat laaditaan luminometrilaitteen ohjelmalla ja siirretään luminometri-laitteeseen. Näytteenottosuunnitelmaan kuuluu näytteenottotiheyden, näytteenottokohteiden ja raja-arvojen määrittäminen. Työhön kuuluu myös kirjallisten näytteenotto-ohjeiden luominen, henkilökunnan kouluttaminen näytteenottoon ja poikkeamakirjanpidon kehittäminen sekä toimenpiteiden määrittäminen poikkeamia varten. Tulosten käsittelyä varten kehitetään tulos-
taulukot ja -kuvaajat, jotka voidaan tarvittaessa jakaa osastojen vastaaville. Työn aikana kerättyjä tuloksia analysoidaan ja verrataan keskenään.

7 Materiaalit ja menetelmät

7.1 Näytteenottokohteiden määrittäminen

Pintapuhtausnäytteenottosuunnitelmaan sisältyy tuotantolaitoksen kolme eri osastoa; fileointiosasto, sushiosasto ja catering-osasto, joka keskittyy kalastustuotteiden jatkojalosteiden valmistukseen. Näiden osastojen lisäksi yrityksen yhteydessä toimiva tehtaanyymälä kuuluu näytteenottosuunnitelman piiriin.

Osastoilla käsitellään muiden muassa raakoja tuotteita, jotka asiakas syö kuumentamattomina, ja kuumennettuja tuotteita, jotka syödään sellaisenaan. Tämä lisää hygieenisten työskentelytapojen ja pintapuhtaushygienian merkitystä.

Näytteenottosuunnitelman laatiminen aloitettiin näytteenottokohteiden määrittämisellä. Alustavaa selvitystä varten otettiin näytteitä jokaisen osaston ja myymälän pinnoilta, jotka katsottiin kriittisiksi kohteiksi, sekä muilta satunnaisesti valituilta pinnoilta, jotka ovat kosketuksissa elintarvikkeiden tai henkilökunnan kanssa. Erityisesti moniosaiset ja vaikeasti purettavat laitteet, sekä päivittäin käytössä olevat välineet ja pinnat kuuluivat näytteenottokohteiden joukkoon. Erityisesti laitteet ja koneet on kirjallisuudessa todettu olevan kalateollisuuden kontaminaatioalttiita kohteita. Näytteitä otettiin yrityksen antaman maksimimäärän verran. Näytteet otettiin 3M Clean Trace kertakäyttöisillä näytteenottopuikoilla ja tulosten mittaamiseen käytettiin yrityksen 3M Clean Trace luminometriä. Kuvassa 2 on valmistajan kuva vastaavista näytteenottovälineistä. Luminometri antaa mittaustuloksen noin kymmenessä sekunnissa.



Kuva 2. 3M Clean Trace luminometri ja näytteenottopuikko [14]

Näytteenottokohteet määritettiin lopulta alustavien näytteenottotulosten perusteella siten, että kohteet edustaisivat mahdollisimman laajaa otosta yrityksen tuotantopinnoista ja välineistä. Lisäksi valintaan vaikutti kohteiden merkitys mahdollisen kontaminantin sisältäjänä. Suunnitelman näytteenottokohteita on tarkoitus päivittää tasaisin väliajoin yrityksen toimesta opinnäytetyön päättymisen jälkeen.

7.2 Näytteenottotiheyden ja raja-arvojen määrittäminen

Näytteenottotiheyden määrittämiseen vaikutti yrityksen omavalvontasuunnitelman ohjeistus ja elintarviketeollisuuden HACCP-pohjainen omavalvontaohje kalateollisuudelle. Ohjeen mukaan omavalvontanäytteiden näytteenottotiheys voi vaihdella tuotantomääristä riippuen joka toinen viikko otettavista näytteistä neljännesvuosittain tehtäviin tutkimuksiin. [15, s. 14]. Näytteenottotiheyden tulee olla suhteutettu riskitasoon, mitä korkeamman riskin tuotantotiloista on kyse, sitä useammin tulee näytteitä ottaa. Koska yrityksen tuotantotiloissa käsitellään elintarvikkeita, jotka kuluttaja syö kuumentamattomina, oli näytteenottotiheyden oltava tarpeeksi suuri.

Hyväksytyn ja hylätyn mittaustuloksen raja-arvot määritettiin alustavasti luminometrin maahantuojayrityksen, Labeman, viitteellisten elintarvikeympäristöön soveltuvien raja-

arvojen perusteella. Lisäksi yrityksellä oli aiemmin ollut käytössä kyseiset raja-arvot, joten päätettiin, että ne voivat toimia lähtökohtaisina raja-arvoina.

Kahden kuukauden tulosseurannan perusteella raja-arvoja laskettiin, kun pyrkimyksenä oli parantaa puhdistustasoa. Työtä varten tulosten kerääminen lopetettiin yhtäjaksoisesti neljä kuukautta kestäneen seurannan jälkeen, mutta yritys luonnollisesti jatkaa omaa tulosseurantaansa tämän työn päättymisen jälkeenkin.

7.3 Näytteenotto-ohjeiden luominen ja henkilökunnan koulutus

Näytteenotto-ohjeet luotiin yrityksen omavalvontaa varten ja henkilökunnan koulutuksen tueksi. Näytteenotto-ohjeisiin kirjattiin yleisohjeiden lisäksi seikkaperäiset, kuvalliset ohjeet jokaiselle näytteenottokohteelle osastoittain. Yleisohjeessa opastettiin luminometrin käyttöön ja mittauksen suorittamiseen, näytteenottopinnan valintaan, sekä kerrottiin toimintaohjeet mahdollista uusintänäytteenottoa varten.

Henkilökunnan koulutus toteutettiin kahdessa erässä. Ensimmäiseen koulutusryhmään kuului yrityksen henkilökuntaa, jotka vastaavat catering- ja sushiosastojen näytteenotosta. Toiseen koulutusryhmään kuului fileointiosaston henkilökuntaa. Koulutukset toteutettiin ensimmäisen ryhmän kanssa heidän työpäivän päätteeksi, jolloin oli mahdollista harjoitella näytteenottoa käytännössä näytteenottosuunnitelman mukaisilla kohteilla. Toisen ryhmän kanssa koulutus toteutettiin kesken työpäivän, jolloin osa näytteenottokohteista oli käytössä, eikä jokaista kohdetta ollut mahdollista käydä läpi yksityiskohtaisesti.

Henkilökunnan kouluttaminen näytteenottoon on tärkeää, sillä menetelmä on herkkä kontaminaatioille. Tulos vääristyy herkästi, mikäli näytteenottopuikko osuu näytteenottajan ihoon tai kostealle pinnalle. Koulutuksen avulla varmistettiin, että näytteet ovat oikeaoppisesti otettuja, mahdollisimman edustavia ja tasalaatuisia, ja siten vertailtavissa toisiinsa. Myymälän näytteenottovastuu on yrityksen laadunvalvojalla. Täten ei katsottu tarpeelliseksi järjestää erillistä koulutusta myymälän näytteenottoa varten, kun kyseessä on kokenut laadunvalvoja ja käytössä on yksityiskohtaiset näytteenotto-ohjeet.

Näytteenotto-ohjeiden lisäksi laadittiin jokaiselle osastolle laminoidut palautekortit, jotka mahdollistavat mittaustuloksen tiedottamisen (hyväksytty, välttävä, hylätty) osastolla työskentelevälle henkilökunnalle, mikäli he eivät ole paikalla näytteenoton aikana. Palautekortit on kuitattava ja palautettava laadunvalvojalle seurantaan varten. Palautekorttien tarkoituksena on paitsi todentaa kohteelle suoritettut puhdistukset, myös toimia positiivisena palautteena ja motivoida henkilökuntaa, kun mittaustulokset ovat olleet hyväksyttyjä.

7.4 Poikkeamakirjanpito ja uusintanäytteet

Kaikki luminometrillä mitatut näytteenottosuunnitelmaan kuuluvat tulokset tallentuivat laitteeseen automaattisesti ja laitteen tulokset siirrettiin säännöllisesti tietokoneelle. Tuloksista laadittiin värikoodattuja taulukoita ja kuvaajia seurantaan helpottamaan. Mittaustuloksen ylittäessä sallitun raja-arvon (läpäisyarvo, hyväksytyn tuloksen raja-arvo), tuli kohde puhdistaa ennen tuotannon aloittamista. Puhdistetusta kohteesta oli lisäksi otettava uusintanäyte, mikäli pinnan olosuhteet mahdollistivat sen ennen tuotannon aloittamista. Muussa tapauksessa uusintanäyte oli otettava määrätyn ajanjakson sisällä. Tietyn kohteen toistuvista hylätyn raja-arvon ylittävistä mittaustuloksista seuraa puhdistusohjelman tarkistus ja läpikäynti puhtaanapidosta vastaavan henkilön kanssa.

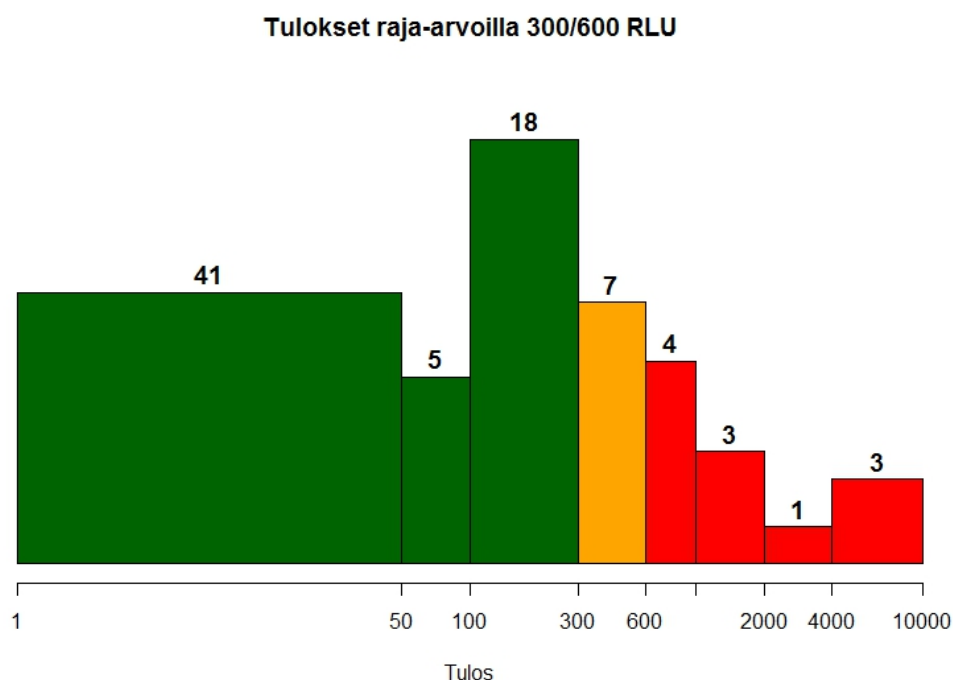
8 Tulokset

Opinnäytetyöhön kuuluvan tulosseurannan aikana otettiin yhteensä 133 näytettä. Tulosten käsittelyssä osastot on nimetty osastoiksi A, B ja C ja lisäksi erillisenä osastona toimii myymälä. Yhtä näytettä ei ole sijoitettu osastoon kuuluvaksi, eikä sitä ole otettu huomioon osastojen välisissä vertailuissa. Lopulliset tulosmäärät vaihtelevat osastoittain, myymälän näytteenottomäärän ollessa selvästi pienempi kuin muiden osastojen. Seuranta-ajan tuloksia ei tässä julkisessa opinnäytetyössä esitetä yksityiskohtaisissa tulostaulukoissa tai -kuvaajissa, jotka ovat yrityksen omassa käytössä.

Tulosseurannan alkaessa hyväksytyn ja hylätyn tuloksen raja-arvoiksi valittiin 300 RLU ja 600 RLU. Luminometrimittauksessa saadun tuloksen ollessa 300 RLU tai pienempi, oli tulos hyväksytty; kun tulos oli yli 300 RLU mutta pienempi kuin 600 RLU, oli tulos välttävä; tuloksen ollessa 600 RLU tai suurempi, oli tulos hylätty.

Kahden kuukauden tulosseurannan jälkeen raja-arvoja päätettiin laskea, kun tavoitteena oli parantaa vallitsevaa puhtaustasoa ja saadut tulokset mahdollistivat raja-arvojen laskun. Raja-arvojen laskun jälkeen hyväksytyn tuloksen raja-arvoksi valittiin 200 RLU ja hylätyn raja-arvoksi 400 RLU luminometrin maahantuojayrityksen ohjeellisen vaihteluvälitaulukon (liite 1) perusteella. Kuvissa 3, 4 ja 5 hyväksytyt tulokset on merkitty tummanvihreällä, välttävät tulokset oranssilla ja hylätyt tulokset punaisella.

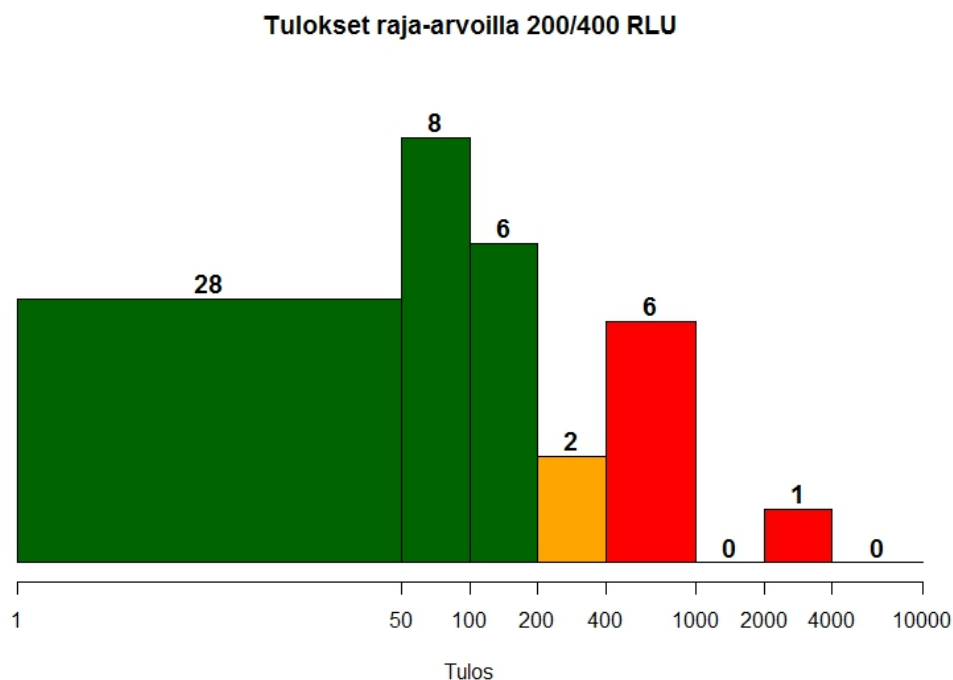
Kuvassa 3 on esitetty kahden ensimmäisen seurantakuukauden aikana kerättyjen tulosten jakauma histogrammilla. Histogrammi on laadittu R-ohjelman avulla. Asteikko on logaritminen ja tulokset on esitetty RLU-yksiköissä, eli suhteellisen valoyksiköiden määränä. Kahden ensimmäisen seurantakuukauden aikana tuloksia kertyi 82 kappaletta, joista hyväksyttyjä tuloksia oli 78 %, välttäviä tuloksia yhdeksän prosenttia ja hylätyjä tuloksia 13 %.



Kuva 3. R-ohjelmalla laadittu histogrammi kahden ensimmäisen kuukauden tuloksista. Palkkien yläpuolella olevat luvut osoittavat tulosten lukumäärän (n=82) ja värit osoittavat tuloksen laadun.

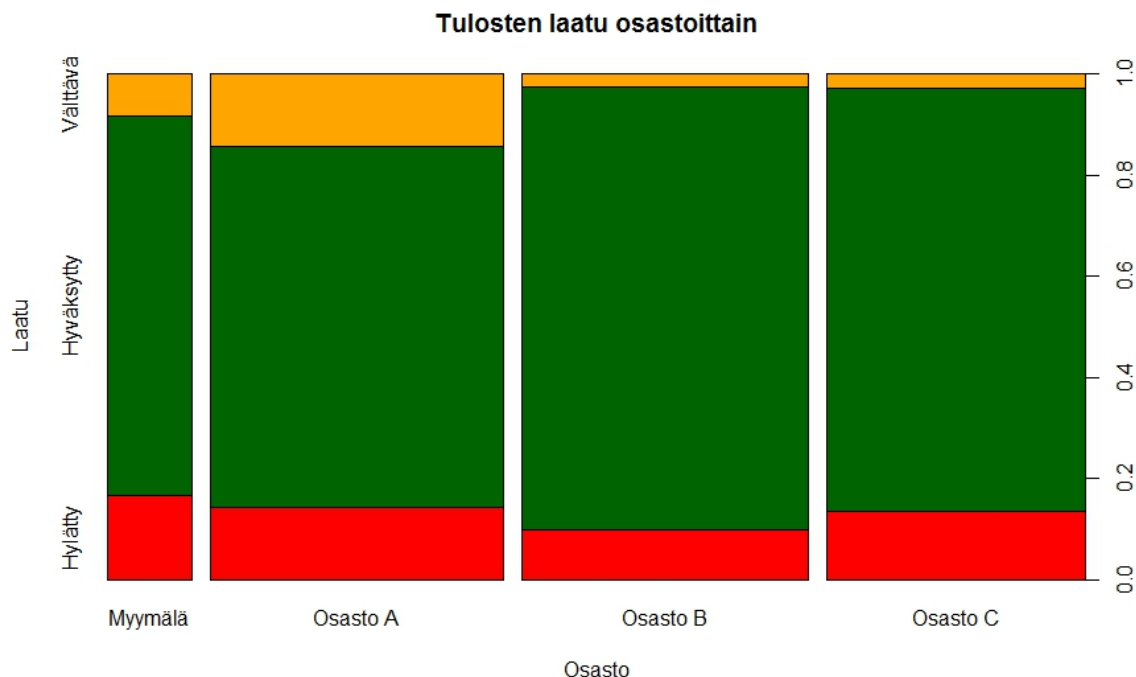
Kuvassa 4 on vastaava histogrammi tuloksista raja-arvojen muutoksen jälkeen. Tuloksia kertyi 51 kappaletta tämän opinnäytetyön tulosseurannan päättymiseen asti. Hy-

väksytyjen tulosten lukumäärä nousi 82 %:iin, välttävien tulosten lukumäärä laski neljään prosenttiin ja hylättyjen tulosten lukumäärä nousi yhden prosenttiyksikön 14 %:iin.



Kuva 4. R-ohjelmalla laadittu histogrammi tuloksista raja-arvojen laskemisen jälkeen. Palkkien yläpuolella olevat luvut osoittavat tulosten lukumäärän (n=51) ja värit osoittavat tuloksen laadun.

Kuva 5 osoittaa tulosten laadun (hyväksytty, välttävä, hylätty) jakauman osastojen kesken koko tulosseurannan aikana. Osastolla B oli eniten hyväksyttyjä tuloksia, hyväksyttyjen tulosten prosentuaalisen osuuden ollessa 88 %. Osastolla C hyväksyttyjen tulosten osuus oli 84 %. Myymälän ja osaston A tuloksista yli 20 % olivat ei-hyväksyttyjä, eli välttäviä tai hylättyjä. Myymälän hyväksyttyjen tulosten osuus oli 75 % ja osaston A vastaava osuus 71 %.



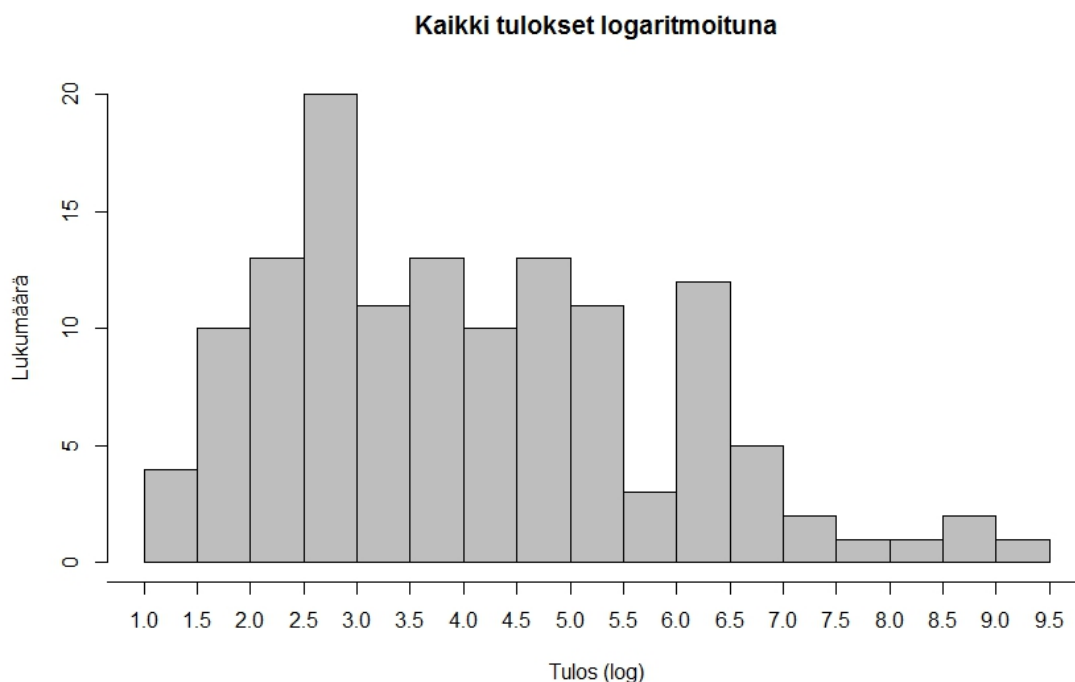
Kuva 5. Hyväksyttyjen, välttävien ja hylättyjen tulosten prosentuaalinen määrä osastoittain koko tulosseurannan aikana.

Hylätyistä näytteistä oli ohjeistuksen mukaan otettava uusintanäyte puhdistuksen jälkeen tai tietyn ajanjakson sisällä ja tämä toteutui tulosseurannan aikana hyvin. Otetuista uusintanäytteistä 92 % sai hyväksytyn tuloksen, eli puhdistus on vaikuttanut positiivisesti mittaustulokseen.

9 Tulosten tarkastelu ja varianssianalyysi

Yksisuuntainen varianssianalyysi, eli yksisuuntainen ANOVA (analysis of variance), on varianssianalyysimalleista yksinkertaisin [16, s. 27]. Sitä käytetään, kun ryhmitteleviä tekijöitä on vain yksi [17, s. 232]. Yksisuuntaisen ANOVA:n tavoitteena on selvittää eroavatko vertailtavat menetelmät toisistaan tilastollisesti merkitsevästi [18, s. 19]. Varianssianalyysin käyttö tutkimusmenetelmänä edellyttää, että otokset ovat riippumattomia ja satunnaisia, muuttujat määrällisiä ja lähes normaalisti jakautuneita, ja että ryhmien varianssit ovat samaa suuruusluokkaa [17, s. 232]. Kuva 6 osoittaa tulosten jakauman histogrammissa. Tässä työssä tarkastellaan menetelmien lisäksi eri ryhmien, kuten osastojen, kohderyhmien ja puhdistusmenetelmien välisiä eroja. Varianssiana-

lyysit on laadittu MS Excel -ohjelman avulla ja analyysien tulostukset löytyvät kokonaisuudessaan liitteestä 2.



Kuva 6. Kaikki tulokset esitetty histogrammissa logaritmoituna, jossa tulosten jakauma on jokseenkin normaalijakauman suuntainen.

Varianssianalyysin nollahypoteesiksi (H_0), eli analyysin yhdeksi vaihtoehtoiseksi tulokseksi, valitaan yleensä vallitsevaa olotilaa kuvaava oletus, joka olettaa, että vertailtavien seikkojen välillä ei ole eroa. Nollahypoteesin vastahypoteesi (H_1), on analyysin toinen vaihtoehtoinen tulos, jota kuvataan "väitteeksi" tai "epäilykseksi". Tässä tapauksessa nollahypoteesin vastahypoteesi olisi, että ainakin yksi seikoista poikkeaa muista. [19, s. 80] Perusoletus on, että nollahypoteesi on voimassa, ellei tilastollisten testien avulla voida muuta todistaa [17, s. 219].

Varianssianalyysin p-arvo kertoo testituloksen todennäköisyyden, eli kuinka suurella todennäköisyydellä saatu tulos saadaan aikaan sattumalta [19, s. 82; 20]. P-arvo, eli merkitsevyystaso tai riskitaso, osoittaa nollahypoteesin paikkansapitävyyden todennäköisyyttä [17, s. 220; 20]. Tietokoneen laskeman p-arvon avulla tehdään päätös hylätäänkö nollahypoteesi vai ei. Jos saatu p-arvo on suurempi kuin merkitsevyystaso 0,05 (joka tarkoittaa 95 %:n luottamustasoa), nollahypoteesia ei hylätä. Jos p-arvo on pienempi kuin 0,05, nollahypoteesi hylätään. Nollahypoteesin hylkäämättä jättäminen (nol-

lahypoteesia ei hylätä) ei kuitenkaan osoita, että vastahypoteesi olisi virheellinen. [19, s. 82]

Vaikka luminometrimenetelmässä näytteenotto on yksinkertainen toimenpide, voivat näytettä ottaessa sattuneet mahdolliset virheet vaikuttaa tuloksiin ja näiden analyysien perusteella tehtyihin johtopäätöksiin. Näytteenottopuikon osuessa näytteenottajan ihoon tai kostealle pinnalle näytteenoton yhteydessä, muuttuu mittaustulos epäluotettavaksi. Myös näytteenottopinta-alan vaihtelevuus ja voimakkuus, jolla näytteenottopuikkoa hierotaan näytteenottokohtaan, voivat tuoda vaihtelua tulosten tasalaatuisuuteen. Virheiden mahdollisuutta ei voida sulkea pois, kun tulosseurannan aikaiset näytteenotot on suoritettu usean eri henkilön toimesta. Näitä mittausvirheitä on pyritty minimoimaan koulutuksen ja kirjallisten näytteenotto-ohjeiden avulla.

9.1 Osastojen välinen vertailu

Kuvassa 7 on havainnollistettu osastoittain ryhmiteltyjen tulosten jakaumaa graafisesti box-and-whisker-kuvaajalla. Tulosten luonteen vuoksi mittaustulokset muutettiin logaritmisiksi graafista havainnollistamista ja varianssianalyysiä varten. Y-akselin logaritmoiduista tuloksista luku 5 vastaa n. 150 RLU:ta ja luku 7 n. 1000 RLU:ta. Kuvasta havaitaan, että kaikkien osastojen mediaani asettuu luvun 5 alle, eli mediaani on selvästi alle hyväksytyjen rajojen (200 tai 300 RLU:ta).

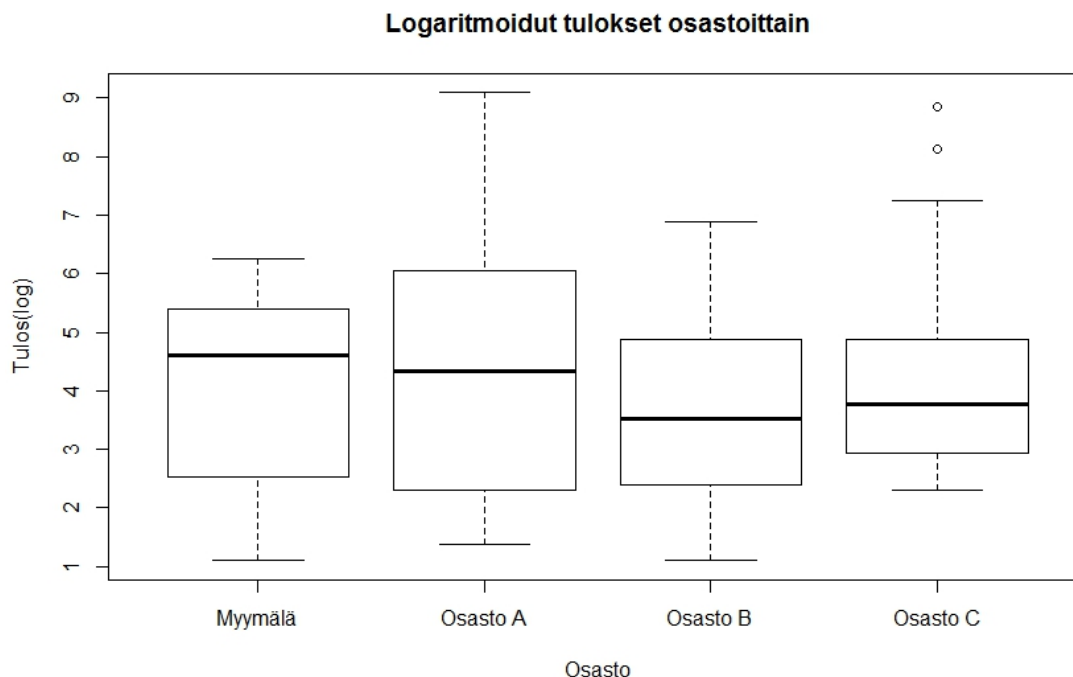
Osastojen välisten tulosten tilastollisessa tarkastelussa hyödynnettiin yksisuuntaista varianssianalyysiä. Yksisuuntaiseen ANOVA:an otettiin mukaan 132 tulosta, jotka olivat eri osastoista ja myymälästä peräisin.

Analyysin hypoteesit:

H_0 : Osastojen välillä ei ole eroa

H_1 : Ainakin yksi osasto poikkeaa muista

MS Excel -ohjelman varianssianalyysin tulosteen mukaan yksisuuntaisella ANOVA:lla saatu p-arvo osastojen väliselle erolle oli 0,39. Tuloste on kokonaisuudessaan tarkasteltavissa liitteessä 2.



Kuva 7. R-ohjelmalla laadittu box-and-whisker-kuvaaja logaritmoiduista tuloksista osastoittain. Laatikon keskellä oleva paksu, musta viiva kuvaa mediaania, laatikon ylä- ja alareunat osoittavat ylä- ja alaneljännekset ja viiksien päät kuvaavat suurinta ja pienintä arvoa, kun poikkeavia arvoja (pienet ympyrät) ei huomioida.

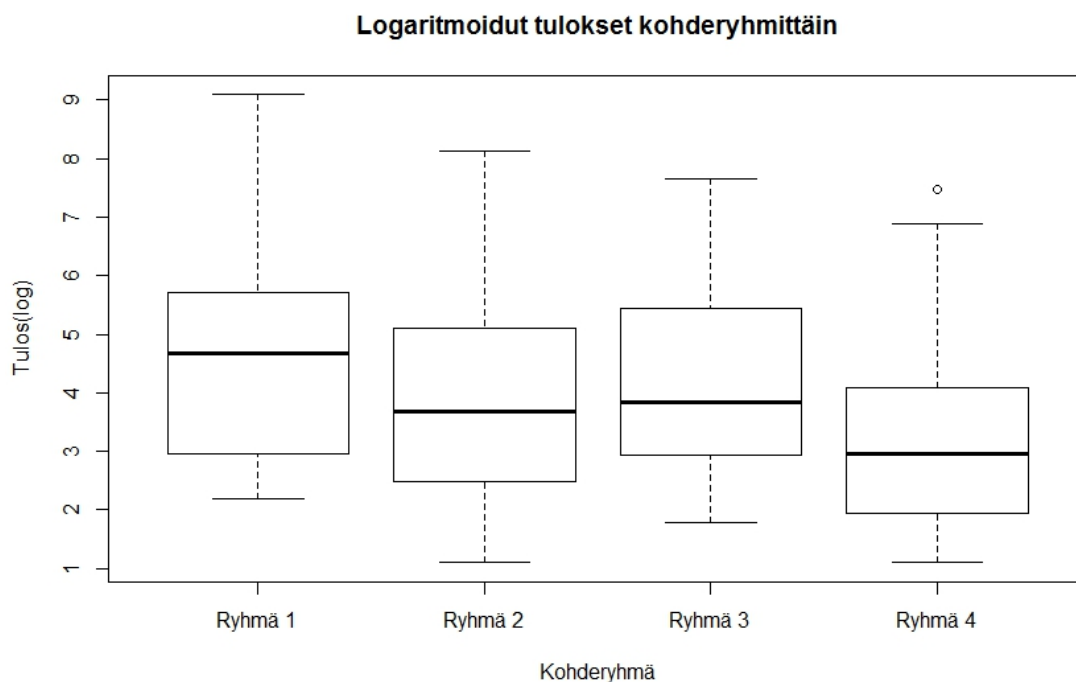
Koska saatu p-arvo oli suurempi kuin merkitsevyystaso 0,05, nollahypoteesia ei hylätty. Johtopäätös varianssianalyysin tulokselle oli, että osastojen välillä ei ole eroa. Kalatukku E. Eriksson Oy:n osastoilta A–C ja myymälästä otetut pintapuhtausnäytteet eivät siis varianssianalyysin tuloksen perusteella eronneet toisistaan.

9.2 Kohteiden välinen vertailu

Näytteenottokohteet ryhmiteltiin tulosten tarkastelua varten neljäksi ryhmäksi. Kohde-ryhmät olivat koneet ja laitteet (ryhmä 1), välineet (ryhmä 2), työskentelypinnat (ryhmä 3) ja muut kohteet (ryhmä 4). Tulosten luonteen vuoksi mittaustulokset muutettiin logaritmisiksi graafista havainnollistamista ja varianssianalyysiä varten.

Kuvassa 8 on havainnollistettu kohderyhmien jakaumaa graafisesti box-and-whisker-kuvaajan avulla. Ryhmien 2–4 mediaanit asettuvat luvun 4 alapuolelle (kuvaajan asteikon luku 4 vastaa n. 55 RLU:ta), mutta ryhmän 1 mediaani on lähempänä lukua 5.

Myös ryhmän 1 suurin arvo asettuu korkeammalle kuin muiden ryhmien vastaavat arvot.



Kuva 8. R-ohjelmalla laadittu box-and-whisker-kuvaaja logaritmoiduista tuloksista kohderyhmittäin. Laatikon keskellä oleva paksu, musta viiva kuvaa mediaania, laatikon ylä- ja alareunat osoittavat ylä- ja alaneljännekset ja viiksien päät kuvaavat suurinta ja pienintä arvoa, kun poikkeavia arvoja (pienet ympyrät) ei huomioida.

Kohderyhmille tehtiin myös varianssianalyysi. Yksisuuntaiseen ANOVA:aan otettiin mukaan kaikki 133 tulosta, sillä yksi osastoihin sijoittamaton näyte sijoitettiin kohde-ryhmään.

Analyysin hypoteesit:

H_0 : Kohderyhmien välillä ei ole eroa

H_1 : Ainakin yksi kohderyhmä poikkeaa muista

Yksisuuntaisen ANOVA:n avulla saatu p-arvo kohderyhmien väliselle erolle oli 0,02. Tuloste on kokonaisuudessaan tarkasteltavissa liitteessä 2.

Kohderyhmien välisessä varianssianalyysissä saatu p-arvo oli pienempi kuin merkitsevyystaso 0,05, minkä perusteella nollahypoteesi hylättiin. Kun nollahypoteesi hylättiin, valittiin vastahypoteesi, jonka mukaan ainakin yksi kohderyhmä poikkeaa muista. Yksinomaan yksisuuntaisen varianssianalyysin perusteella ei kuitenkaan voida tehdä johtopäätöksiä siitä, mikä tai mitkä kohderyhmät poikkeavat muista ja minkä suuntainen ero on.

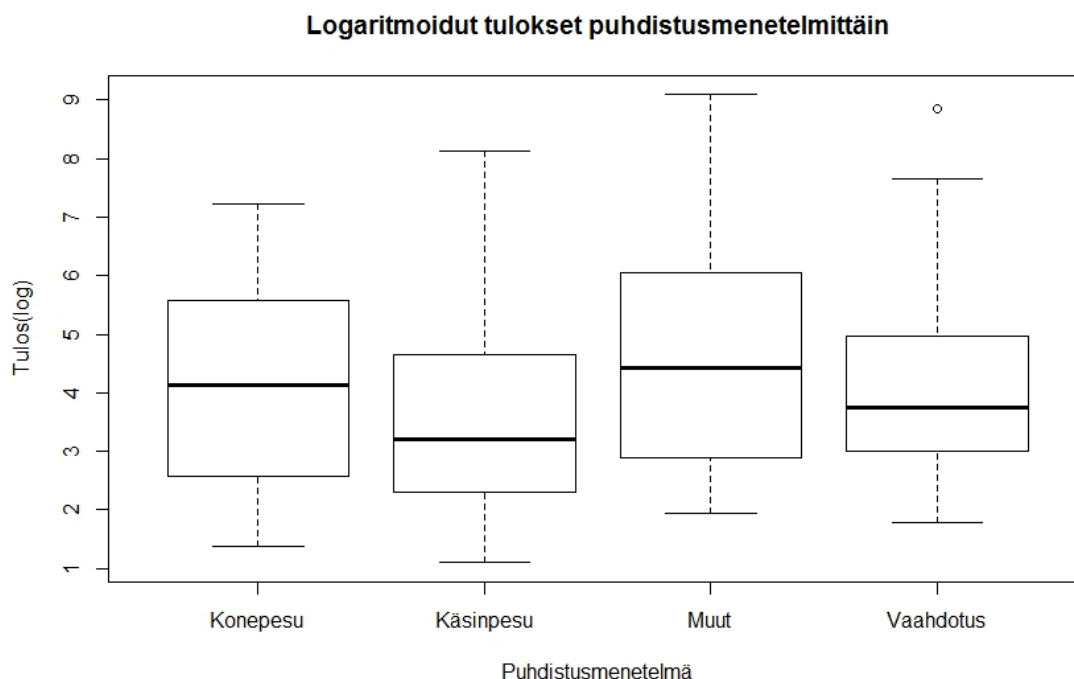
Tukeyn testin (Tukey HSD, honestly significant difference) avulla saadaan vertailtua parittaisten ryhmäkeskiarvojen eroja [17, s. 233]. Kohderyhmien vertailulle tehtiin Tukeyn testi R-ohjelman avulla. Testin luottamustasoksi valittiin 95 %. Tukeyn testi (liite 3) osoitti, että vain ryhmien 1 ja 4 välillä oli tilastollisesti merkitsevä ero (p-arvo 0,01), muiden parivertailujen p-arvot olivat merkitsevyystasoa suuremmat.

Tilastollisten testien perusteella koneista ja laitteista (ryhmä 1) otetut pintapuhtausnäytteet erosivat tilastollisesti merkitsevästi ryhmään 4 kuuluvista kohteista otetuista näytteistä.

9.3 Puhdistusmenetelmien vertailu

Puhdistusmenetelmien vertailua varten kohteista muodostettiin neljä eri ryhmää näytteenottokohteiden puhdistusmenetelmän perusteella. Kohteet jaettiin vaahdotettaviin kohteisiin (vaahdotus), konepestäviin kohteisiin (konepesu), käsin pestäviin kohteisiin (käsinpesu) ja muilla tavoin puhdistettaviin kohteisiin (muut). Konepesu-ryhmään kuuluvat kaikki kohteet, jotka puhdistetaan koneellisesti, riippumatta siitä, onko kone vettä vaihtava vai samaa vettä kierrättävä. Tulosten luonteen vuoksi tulokset muutettiin logaritmisiksi analyysiä ja graafista havainnollistamista varten.

Kuvassa 9 on havainnollistettu puhdistusmenetelmän perusteella ryhmiin jaettujen kohteiden tulosten jakaumaa graafisesti box-and-whisker-kuvaajalla. Kaikkien ryhmien mediaanit sijaitsevat lukujen 3 ja 5 välillä. Käsin pestävien ja vaahdotettavien kohteiden mittaustulosten yläneljännekset sijoittuvat myös luvun 5 alle, joka vastaa noin 150 RLU:ta.



Kuva 9. R-ohjelmalla laadittu box-and-whisker -kuvaaja logaritmoiduista tuloksista puhdistusmenetelmittäin. Laatikon keskellä oleva paksu, musta viiva kuvaa mediaania, laatikon ylä- ja alareunat osoittavat ylä- ja alaneljännekset ja viiksien päät kuvaavat suurinta ja pienintä arvoa, kun poikkeavia arvoja (pienet ympyrät) ei huomioida.

Puhdistusmenetelmiä vertailevaan yksisuuntaiseen varianssianalyysiin otettiin mukaan kaikki 133 tulosta.

Analyysin hypoteesit:

H_0 : Puhdistusmenetelmien välillä ei ole eroa

H_1 : Ainakin yksi puhdistusmenetelmä poikkeaa muista

Yksisuuntaisen ANOVA:n avulla saatu p-arvo puhdistusmenetelmien erolle oli 0,08. Tuloste on kokonaisuudessaan tarkasteltavissa liitteessä 2. Koska saatu p-arvo on pienempi kuin 0,1, mutta suurempi kuin 0,05, voidaan tulosta nimittää suuntaa antavaksi [17, s. 221].

Puhdistusmenetelmien varianssianalyysissä saatu p-arvo oli suurempi kuin merkitsevyystaso 0,05, joten nollahypoteesia ei hylätty. Johtopäätös oli, että puhdistusmenetelmien välillä ei ole eroa. Eri puhdistusmenetelmillä puhdistetut Kalatukku E. Eriksson

Oy:n näytteenottokohteet eivät siis varianssianalyysillä saatujen tulosten perusteella eronneet toisistaan. P-arvo oli kuitenkin lähellä valittua merkitsevyystasoa, joten aineistoa tulisi kerätä lisää ja toistaa analyysi johtopäätöksen varmistamiseksi.

10 Yhteenveto

Tässä opinnäytetyössä laadittiin Kalatukku E. Eriksson Oy:lle näytteenottosuunnitelma luminometrillä suoritettavia pintapuhtausmittauksia varten. Ennen opinnäytetyön laatimista yrityksen luminometrimittaukset olivat olleet vaihtelevalla tiheydellä otettuja ja näytteenottopinta-ala ja -tapa olivat vaihdelleet. Opinnäytetyön johdosta yrityksellä on johdonmukainen näytteenottosuunnitelma luminometrimittauksia varten ja näytteenottosuunnitelma kirjallisine ohjeineen sisällytettiin yrityksen omavalvontaan. Yrityksen henkilökunta on koulutettu näytteenottoon, jotta näytteenottotekniikka olisi oikeanlainen, näytteet edustavia ja saadut tulokset vertailukelpoisia. Näytteenottosuunnitelmaa tulee päivittää säännöllisin väliajoin, jolloin näytteenottosuunnitelmasta voidaan poistaa ne kohteet, joiden mittauksien tulokset ovat tarpeeksi alhaisia, ja lisätä uusia kohteita. Uudet kohteet voidaan valita muuttuneiden työskentelytapojen tai uusien laitteiden perusteella. Uusia kohteita tulee sisällyttää näytteenottosuunnitelmaan, vaikka prosesseissa tai tuotantotavoissa ei tapahtuisi muutoksia, jotta näytteitä tulee otettua tarpeeksi monipuolisesti. Puhtaanapidon seurantajärjestelmän kehittämistyö on jatkuva prosessi, joka ei pääty tämän opinnäytetyön tuloksiin.

Tuloseurannan ja tuloksista tehtyjen varianssianalyysien tulosten perusteella voidaan olettaa, ettei yrityksen puhtaustaso vaihtelee merkitsevästi eri osastoiden tai käytettyjen puhdistusmenetelmien välillä. Yksittäisten kohteiden välillä on kuitenkin havaittavissa eroja, sillä varianssianalyysi osoitti kahden kohderyhmän eroavan toisistaan tilastollisesti merkitsevästi. Koneista ja laitteista saadut tulokset kuuluivat tähän poikkeavaan kohderyhmään. Yleisesti voidaan todeta kohteiden materiaalin, muodon, iän ja kuluneisuuden sekä käyttötavan voineen vaikuttaa tuloksiin. Kuten tämän opinnäytetyön kirjallisessa osassa on aiemmin todettu, ovat kalateollisuuden ongelmakohtat tuotantohygienian näkökulmasta erityisesti laitteet, jotka ovat hankalasti purettavissa ja puhdistettavissa. Työn kokeellisessa osassa saadut tulokset tukevat tätä väitettä. Näytteenottosuunnitelmaa päivitettäessä tulisi myös huomioida laitteiden ja koneiden merkitys mahdollisina ongelmakohtina.

Mittaustulosten laadun vertailussa havaittiin kuitenkin, että myymälän ja osaston A tuloksissa hyväksytyn raja-arvon alle asettuvia tuloksia on vähemmän kuin B- ja C-osastoilla. Ennen opinnäytetyön laatimisen aloitusta on yrityksessä tiedostettu myymälän ja osaston A olevan haasteellisia alueita pintahygieniansa suhteen, sillä niissä käsitellään kypsennettyjä tuotteita. Opinnäytetyössä saatujen tulosten perusteella voidaan todeta, että osaston A ja myymälän puhdistusmenetelmiin ja -käytäntöihin tulisi jatkossa kiinnittää erityistä huomiota. Lisäksi on suositeltavaa, että myymälän näytteenottotiheys olisi samalla tasolla muiden osastojen näytteenoton kanssa.

Lähteet

- 1 Hatakka, M., Pakkala, P., Siivonen, P. & Turja, M. 2004. Elintarvikehygienia: Hygieniaosaaminen ja omavalvonta. Helsinki: WSOY
- 2 Ijäs, Tuija & Välimäki, Maija-Liisa. 2004. Elintarvikehygienia ja -lainsäädäntö. Helsinki: Otava
- 3 Elintarvikelaki. 13.1.2006/23. Verkkodokumentti.
<<http://www.finlex.fi/fi/laki/ajantasa/2006/20060023>> Luettu 3.3.2015
- 4 Maa- ja metsätalousministeriön asetus laitosten elintarvikehygieniasta. 1369/2011. Verkkodokumentti. <<http://www.finlex.fi/fi/laki/alkup/2011/20111369>> Luettu 3.3.2015
- 5 Korkeala, Hannu. 2007. Elintarvikehygienia, ympäristöhygienia, elintarvike- ja ympäristötoksikologia. Helsinki: WSOY
- 6 Elintarviketurvallisuusvirasto. 2012. Verkkodokumentti.
<<http://www.evira.fi/portal/fi/elintarvikkeet/hygieniaosaaminen/tietopaketti/puhtaanapito/puhdistusaineet/>> Luettu 4.3.2015
- 7 Labema. Biotox-pesuainejäätymätesti. Verkkodokumentti.
<<http://www.labema.fi/tuote-1243-50>> Luettu 26.4.2015
- 8 Bagge-Ravn, D., Ng, Y., Hjelm, M., Christiansen, J. N., Johansen, C. & Gram, L. 2003. The microbial ecology of processing equipment in different industries – analysis of the microflora during processing and following cleaning and disinfection. *International Journal of Food Microbiology* 87, s. 239–250
- 9 Elintarviketurvallisuusvirasto. 2013. Elintarvikkeiden säilyttäminen. Verkkodokumentti.
<<http://www.evira.fi/portal/fi/elintarvikkeet/hygieniaosaaminen/tietopaketti/elintarvikkeiden+hygieeninen+kasittely/elintarvikkeiden+sailyttaminen>> Luettu 3.3.2015
- 10 Srey, S., Jahid, I. K. & Ha, S. 2013. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control* 31, s. 572–585
- 11 Shi, Xianming. & Zhu, Xinna. 2009. Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science & Technology* 20, s. 407–413
- 12 Hawronskyj, Jane-Marie. & Holah, John. 1997. ATP: A universal hygiene monitor. *Trends in Food Science & Technology* vol. 8, s. 79–84

- 13 Tunick, M., Palumbo, S. & Fratamico, P. 2010. New techniques in the Analysis of Foods. New York: Kluwer Academic/Plenum publishers.
- 14 3M Clean Trace, Contact us. Kuva verkkodokumentista.
<<http://www.3m.co.uk/intl/uk/healthcare/Clean-Trace/Clean-Trace%20Website/Final/contact-us.htm>> Luettu 3.3.2015
- 15 Elintarviketeollisuusliitto. 2006. Elintarviketeollisuuden HACCP-pohjainen oma-valvontaohje - Kalateollisuus. Verkkodokumentti.
<http://www.etl.fi/www/fi/julkaisut/Julkaisut/Kalaohje_0606131.pdf> Luettu 4.3.2015
- 16 Bird, Kevin D. 2004. Analysis of Variance via Confidence Intervals. Lontoo: SAGE Publications Ltd
- 17 Karjalainen, Leila. 2010. Tilastotieteen perusteet. Keuruu: Otavan Kirjapaino Oy.
- 18 Taavitsainen, Veli-Matti. 2011. Koesuunnittelun kurssi.
- 19 Taavitsainen, Veli-Matti. 2011. Tilastomatematiikan peruskurssi.
- 20 Salonen, Jaakko. 2012. Mikä on p-arvo ja miten sitä mitataan? Verkkodokumentti. < <http://blite.iki.fi/artikkelit/p-arvo/>> Luettu 16.2.2015
- 21 Labema Oy. ATP-menetelmän käyttöönotto.

Luminometrin maahantuojayrityksen taulukko raja-arvojen vaihteluvälien ohjearvoista

Taso	Läpäisy (RLU)	Varoitus (RLU)	Hylkäys (RLU)
A	1000	1001-1999	2000
B	750	751-1499	1500
C	500	501- 999	1000
D	400	401- 799	800
E	300	301- 599	600
F	250	251- 499	500
G	200	201- 399	400
H	150	151- 299	300
J	100	101-199	200

Kuva 1. Labeman ohjearvot vaihteluvälien raja-arvoiksi [21, s. 3]

Varianssianalyysin tulokset

Taulukko 1. MS Excel-ohjelman tuloste yksisuuntaisesta varianssianalyysistä (osastot)

Anova: yksisuuntainen						
YHTEENVETO						
<i>Ryhmät</i>	<i>Lukumäärä</i>	<i>Summa</i>	<i>Keskiarvo</i>	<i>Varianssi</i>		
Osasto C	37	155,217581	4,195069747	2,641017625		
Osasto B	41	150,813808	3,678385553	2,43985591		
Osasto A	42	181,539584	4,322371043	4,244785313		
Myymä	12	48,7217478	4,060145646	2,860053023		
ANOVA						
<i>Vaihtelun lähde</i>	<i>NS</i>	<i>va</i>	<i>KN</i>	<i>F</i>	<i>P-arvo</i>	<i>F-kriittinen</i>
Luokkien välissä	9,536002504	3	3,178667501	1,021854583	0,385316	2,67538727
Ryhmissä	398,167652	128	3,110684781			
Yhteensä	407,7036545	131				

Taulukko 2. MS Excel-ohjelman tuloste yksisuuntaisesta varianssianalyysistä (kohderyhmät)

Anova: yksisuuntainen						
YHTEENVETO						
<i>Ryhmät</i>	<i>Lukumäärä</i>	<i>Summa</i>	<i>Keskiarvo</i>	<i>Varianssi</i>		
Kohderyhmä 1	36	168,737	4,687126	3,31865		
Kohderyhmä 2	36	140,815	3,911536	2,930473		
Kohderyhmä 3	37	155,746	4,209356	2,67005		
Kohderyhmä 4	24	78,4638	3,269324	3,204533		
ANOVA						
<i>Vaihtelun lähde</i>	<i>NS</i>	<i>va</i>	<i>KN</i>	<i>F</i>	<i>P-arvo</i>	<i>F-kriittinen</i>
Luokkien välissä	30,67368803	3	10,22456	3,394632	0,019981	2,6748321
Ryhmissä	388,5453377	129	3,011979			
Yhteensä	419,2190257	132				

Taulukko 3. MS Excel-ohjelman tuloste yksisuuntaisesta varianssianalyysistä (puhdistusmenetelmät)

Anova: yksisuuntainen						
YHTEENVETO						
<i>Ryhmät</i>	<i>Lukumäärä</i>	<i>Summa</i>	<i>Keskiarvo</i>	<i>Varianssi</i>		
Vaahdotus	26	110,1333	4,235896631	2,778843452		
Konepesu	42	172,6283	4,110197493	2,951158126		
Käsinpesu	42	152,5817	3,632897552	2,803625106		
Muut	23	110,4799	4,803474892	4,007165522		
ANOVA						
<i>Vaihtelun lähde</i>	<i>NS</i>	<i>va</i>	<i>KN</i>	<i>F</i>	<i>P-arvo</i>	<i>F-kriittinen</i>
Luokkien välissä	21,0284009	3	7,009466967	2,297456916	0,08065	2,674832
Ryhmissä	393,5748403	129	3,050967754			
Yhteensä	414,6032412	132				

Tukeyn testin tulos

```
> kohteet.aov <- aov(Tulos~kohteet, data=kohteet)
> print(summary(kohteet.aov))
              Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
kohteet         3   30.7   10.225   3.395  0.02 *
Residuals    129  388.5    3.012
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> ?TukeyHSD
> TukeyHSD(kohteet.aov, conf.level=0.95)
  Tukey multiple comparisons of means
    95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = Tulos ~ kohteet, data = kohteet)

$kohteet
              diff              lwr              upr              p adj
Ryhmä 2-Ryhmä 1 -0.7755897 -1.8403125  0.2891331 0.2348548
Ryhmä 3-Ryhmä 1 -0.4777699 -1.5352741  0.5797344 0.6430945
Ryhmä 4-Ryhmä 1 -1.4178016 -2.6081978 -0.2274053 0.0125588
Ryhmä 3-Ryhmä 2  0.2978199 -0.7596844  1.3553241 0.8836493
Ryhmä 4-Ryhmä 2 -0.6422118 -1.8326081  0.5481844 0.4990326
Ryhmä 4-Ryhmä 3 -0.9400317 -2.1239759  0.2439125 0.1696493
```